



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014028160-2 B1



(22) Data do Depósito: 10/05/2013

(45) Data de Concessão: 12/01/2021

(54) Título: USO DE ANTICORPO OU DE SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À SEMAFORINA-4D NO AUMENTO DE PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO OU MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS

(51) Int.Cl.: A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 11/05/2012 US 61/646.119; 15/03/2013 US 13/842.523.

(73) Titular(es): VACCINEX, INC..

(72) Inventor(es): ERNEST S. SMITH; MAURICE ZAUDERER.

(86) Pedido PCT: PCT US2013040661 de 10/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/170221 de 14/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/11/2014

(57) Resumo: USO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO À SEMAFORINA-4D PARA PROMOVER NEUROGÊNESE APÓS ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL. Métodos para promover neurogênese no tecido neural de um paciente que exibe pelo menos um sintoma de um transtorno do sistema nervoso central são fornecidos neste relatório, os quais compreendem administrar a um sujeito em necessidade dos mesmos uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D).

“USO DE ANTICORPO OU DE SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À SEMAFORINA-4D NO AUMENTO DE PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO OU MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIIS”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001]Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao Pedido Não Provisório U.S. Nº 13/842.523, depositado em 15 de março de 2013 e ao Pedido Provisório U.S. Nº 61/646.119, depositado em 11 de maio de 2012, o conteúdo dos quais é integralmente incorporado neste relatório como referência.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS ELETRONICAMENTE APRESENTADA

[002]O conteúdo da listagem de sequências eletronicamente apresentada no arquivo de texto ASCII (Nome: “1843072PC01_SequenceListing.txt”; Tamanho: 7.562 bytes; e Data de Criação: 10 de maio de 2013) depositado com a mesma é integralmente incorporado neste relatório como referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003]Semaforina 4D (SEMA4D), também conhecida como CD 100, é uma proteína transmembrana (por exemplo, SEQ ID NO: 1 (humana); SEQ ID NO: 2 (murino)) que pertence à família do gene da semaforina. SEMA4D é expressa sobre a superfície celular como um homodímero, mas, após a ativação celular, SEMA4D pode ser liberada a partir da superfície celular por intermédio de clivagem proteolítica para gerar sSEMA4D, uma forma solúvel da proteína, que também é biologicamente ativa. Veja, Suzuki *et al.*, Nature Rev. Immunol. 5: 159 - 167 (2003); Kikutani *et al.*, Nature Immunol. 9: 17 - 23 (2008).

[004]SEMA4D é expressa em altos níveis em órgãos linfoides, incluindo o baço, timo e linfonodos, e em órgãos não linfoides, tais como o cérebro, coração e rim. Em órgãos linfoides, SEMA4D é abundantemente expressada em células T em

repouso, mas apenas fracamente expressada em células B em repouso e células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DCs). Sua expressão, entretanto, é suprarregulada nestas células após a ativação através de vários estímulos. A liberação de SEMA4D solúvel a partir de células imunes também é aumentada pela ativação celular.

[005]SEMA4D foi implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes desmielinizantes, tais como esclerose múltipla e certos cânceres. A falha do sistema nervoso do mamífero em se regenerar completamente depois da lesão é um problema clínico principal. Dano neural como um resultado de acidente vascular cerebral ou trauma ao cérebro, assim como doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer, são uma das principais causas de morte e deficiência. Embora o papel da sinalização de SEMA4D através de seus receptores, por exemplo, Plexin-B1, na angiogênese seja bem reconhecido, o efeito da sinalização de SEMA4D sobre a promoção de neurogênese permanece não claro. Portanto, existe uma necessidade quanto ao fornecimento de uma solução à classe médica não satisfeita quanto aos meios terapêuticos de neuro-regeneração.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006]Os métodos para usar moléculas de ligação à Semaforina-4D para a promoção da neurogênese são divulgados neste relatório. Evidência é apresentada demonstrando que SEMA4D pode comprometer a capacidade de regeneração de células neurais. De acordo com os aspectos da invenção ilustrada neste relatório, é fornecido um método para promover neurogênese no tecido neural de um paciente que exhibe pelo menos um sintoma de um transtorno do sistema nervoso central, o método compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente a e/ou inibe semaforina-4D (SEMA4D).

[007]De acordo com os aspectos da invenção ilustrada neste relatório, é for-

recido um método para aumentar o número de células progenitoras em um indivíduo com um transtorno do sistema nervoso central compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D), em que a ligação à SEMA4D atua para aumentar o número de células progenitoras.

[008]De acordo com os aspectos da invenção ilustrada neste relatório, é fornecido um método para promover neurogênese no tecido neural de um paciente que exibe pelo menos um sintoma de um transtorno do sistema nervoso central, compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente à SEMA4D, em que a molécula de ligação inibe competitivamente um anticorpo monoclonal de referência selecionado a partir do grupo que consiste de VX15/2503 ou 67 a partir da ligação específica à SEMA4D.

[009]De acordo com os aspectos da invenção ilustrada neste relatório, é fornecido um método para aliviar um sintoma de uma doença ou transtorno do sistema nervoso central, tal como acidente vascular cerebral, em um paciente compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente a e/ou inibe semaforina-4D (SEMA4D), em que a ligação à SEMA4D atua para aliviar o sintoma.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[010]FIGURA 1: Esquema do protocolo experimental para oclusão da artéria cerebral média (ACM) descrita nos Exemplos.

[011]FIGURAS 2A a 2E: Mostram células tronco/precursoras neurais nas amostras de cérebro pigmentadas para Nestin/Sox2 nas áreas indicadas em 2E após a oclusão da artéria cerebral média (OACM) e tratamento com isotipo controle ("IgG Controle", 2A e 2C) ou MAb 67-2 ("Anti-Sema4D-Ab", 2B e 2D). As amostras de cérebro foram preparadas 7 dias depois da OACM.

[012]FIGURAS 3A a 3D: Mostram (A) a expressão do mRNA através de RT-PCR com análise quantitativa para (B) Sox2, (C) nestin e (D) PLP em relação à actina controle no tecido cerebral de camundongos OACM tratados com isotipo controle (“IgG Controle”) ou MAb 67-2 (“Anti-SEMA4D”). O tecido cerebral foi isolado 7 dias depois da OACM. Nestin e Sox2 são marcadores de células precursoras tronco neurais. PLP é um marcador de mielinização.

[013]FIGURAS 4A a 4D: Mostram o volume total relativo do cérebro e estriado nos hemisférios tratados e não tratados em camundongos OACM tratados com isotipo controle ou MAb 67-2. As medições foram tomadas 30 dias depois da OACM. As FIGS. 4A a 4B mostram as seções cerebrais pigmentadas com NeuN a partir de (A) 1 camundongo isotipo controle representativo (“Controle IgG”) e (B) 1 camundongo tratado com anticorpo anti-SEMA4D representativo (“Anti-SEMA4D”). Volume cerebral é representado pelo volume do estriado (linha cheia) e do hemisfério (linha tracejada). As FIGS. 4C a 4D mostram a razão calculada (L/R) do volume do estriado e hemisférico, respectivamente, para o camundongo isotipo controle (“IgG”) e camundongo tratado com anticorpo anti-SEMA4D (“SEMA”).

[014]FIGURAS 5A a 5B: Mostram a expressão do marcador celular neuronal maduro, NeuN, em camundongos OACM (A) MAb 67-2 (“Sema4D-Ab”) ou (B) isotipo controle (“Controle IgG”) em 30 dias depois da OACM. O estriado na borda do infarto cerebral é indicado com setas.

[015][0015] FIGURAS 6A a C: Mostram a atividade locomotora em área aberta na fase clara e escura de camundongos após OACM e tratamento com isotipo controle (“IgG”) ou MAb 67-2 (“SEMA4D”) em 30 dias depois da OACM, ou camundongos tratados com falsa cirurgia (“SHAM”). As FIGS. 6A a 6B mostram atividade locomotora em fase clara e fase escura, respectivamente. A FIG. 6C mostra a razão da fase escura/clara (D/L) na atividade de locomoção.

[016]A FIGURA 7: Mostra um esquema do protocolo experimental descrito

no Exemplo 6.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

[017] Deve ser observado que o termo “um” ou “uma” entidade se refere a uma ou mais entre tal entidade; por exemplo, entende-se que “um anticorpo anti-SEMA4D” é representado por um ou mais anticorpos anti-SEMA4D. Como tal, os termos “um” (ou “uma”), “um ou mais”, e “pelo menos um” podem ser permutavelmente usados neste relatório.

[018] A frase “neurogênese” é definida neste relatório como proliferação, diferenciação, migração e/ou sobrevivência de uma célula neural *in vivo* ou *in vitro*. Em várias formas de realização, a célula neural é uma célula tronco neural adulta, fetal ou embrionária ou população de células. As células podem estar localizadas no sistema nervoso central ou em outra parte em um animal ou ser humano. As células também podem ser em um tecido, tal como tecido neural. Em algumas formas de realização, a célula neural é uma célula progenitora adulta, fetal ou embrionária ou população de células, ou uma população de células compreendendo uma mistura de células troncos e células progenitoras. As células neurais incluem todas as células tronco do cérebro, todas as células progenitoras do cérebro e todas as células precursoras do cérebro. A neurogênese inclui neurogênese conforme ela ocorre durante o desenvolvimento normal, assim como regeneração neural que ocorre após a doença, dano ou intervenção terapêutica, tal como pelo tratamento descrito neste relatório.

[019] Os termos “célula neural”, “célula tronco”, “célula tronco neural”, “célula precursora”, “células tronco/precursoras neurais” (NSPC) ou “células tronco/progenitoras neurais” (NSPC) são permutavelmente usados para referência a uma célula não diferenciada que é capaz de autorrenovação e diferenciação em neurônios, astrócitos e/ou oligodendrócitos.

[020]O termo “célula progenitora” (por exemplo, célula progenitora neural), conforme usado neste relatório, se refere a uma célula derivada de uma célula tronco que por si só não é uma célula tronco. Algumas células progenitoras podem produzir progênie que estão aptas à diferenciação em mais do que um tipo de célula. Células progenitoras neurais incluem células progenitoras neuronais, que produzem neurônios, e células progenitoras da glia que produzem células astrogliais e/ou oligodendrogliais.

[021]Conforme usado neste relatório, o termo “transtorno do sistema nervoso central” ou um “transtorno do SNC” se refere a um transtorno neurodegenerativo, lesão cerebral aguda (por exemplo, acidente vascular cerebral, lesão da cabeça, paralisia cerebral, infarto cerebral, lesão da medula espinhal, lesão traumática) e certas disfunções do sistema nervoso central “SNC” (por exemplo, depressão, epilepsia e esquizofrenia).

[022]Conforme usado neste relatório, o termo “transtorno neurodegenerativo” se refere à doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e esclerose múltipla. Deve ser observado que um transtorno do SNC também pode ser um transtorno neuroinflamatório. Deve ser avaliado que um transtorno neurodegenerativo pode incluir neuroinflamação. Entretanto, é possível que um transtorno neurodegenerativo exista na ausência de neuroinflamação óbvia. Este é o caso, por exemplo, no último estágio de esclerose múltipla secundária progressiva.

[023]Conforme usado neste relatório, o termo “lesão cerebral aguda” se refere a acidente vascular cerebral, lesão da cabeça, paralisia cerebral, infarto cerebral, lesão da medula espinhal e lesão traumática.

[024]Conforme usado neste relatório, o termo “disfunções do SNC” se refere à depressão, epilepsia e esquizofrenia.

[025]O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quanti-

dade de um anticorpo, polipeptídeo, polinucleotídeo, molécula orgânica pequena ou outro fármaco eficaz para “tratar” uma doença ou transtorno em um indivíduo ou mamífero. No caso de um transtorno neuroinflamatório, a quantidade terapêuticamente eficaz do fármaco pode promover neurogênese através do aumento, por exemplo, da proliferação, diferenciação, migração e/ou sobrevivência de células tronco/precursoras neurais; reduzir, retardar ou interromper uma diminuição nas células neurais; inibir, por exemplo, suprimir, retardar, prevenir, interromper ou reverter uma redução nas células neurais; aumentar o número, densidade e/ou concentração de células neurais; mudança na morfologia ou função de células neurais; ou uma mudança nas interações entre as células neurais; alívio, em algum grau, de um ou mais sintomas associados com uma redução nas células neurais, por exemplo, transtornos neuroinflamatórios; reduzir morbidez e mortalidade; melhorar a qualidade de vida; ou uma combinação de tais efeitos.

[026]Os termos “tratando” ou “tratamento” ou “para tratar” ou “aliviar” ou “para aliviar” se referem a 1) medidas terapêuticas que curam, reduzem, diminuem os sintomas de, reverterem e/ou interrompem a progressão de uma condição ou transtorno patológico diagnosticado e 2) medidas profiláticas ou preventivas que previnem e/ou diminuem o desenvolvimento de uma condição ou transtorno patológico alvejado. Assim, aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com o transtorno; aqueles propensos a ter o transtorno; e aqueles nos quais o transtorno será prevenido. Resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não são limitados a, alívio dos sintomas, diminuição do grau da doença, estado estabilizado da doença (isto é, não agravamento), retardo ou redução da progressão da doença, melhora ou palição do estado da doença, e remissão (se parcial ou total), se detectável ou não detectável. “Tratamento” também pode significar o prolongamento da sobrevivência em comparação à sobrevivência esperada sem o recebimento do tratamento. Aquelos em necessidade de tratamento incluem aqueles já com a condição

ou transtorno, assim como aqueles propensos a ter a condição ou transtorno ou aqueles em que a condição ou transtorno será prevenido.

[027]“Indivíduo” ou “indivíduo” ou “animal” ou “paciente” ou “mamífero”, significa qualquer indivíduo, particularmente, um mamífero, para o qual o diagnóstico, prognóstico ou terapia é desejado. Mamíferos incluem seres humanos, animais domésticos, animais de criação, e animais de zoológico, esporte ou de estimação, tais como cães, gatos, porquinhos da Índia, coelhos, ratos, camundongos, cavalos, gado, vacas, ursos e assim por diante.

[028]Conforme usado neste relatório, as frases, tais como “um indivíduo que se beneficiaria da administração de um anticorpo anti-SEMA4D” e “um animal em necessidade de tratamento” inclui indivíduos, tais como mamíferos, que se beneficiariam da administração de um anticorpo anti-SEMA4D ou outra molécula de ligação à SEMA4D usada, por exemplo, para a detecção de um polipeptídeo de SEMA4D (por exemplo, para um procedimento de diagnóstico) e/ou a partir do tratamento, isto é, palição ou prevenção de uma doença, com um anticorpo anti-SEMA4D ou outra molécula de ligação à SEMA4D.

[029]Uma “molécula de ligação” ou “molécula de ligação ao antígeno” da presente invenção se refere, em seu sentido mais amplo, a uma molécula que se liga especificamente a um determinante antigênico. Em uma forma de realização, a molécula de ligação se liga especificamente à SEMA4D, por exemplo, a um polipeptídeo de SEMA4D transmembrana de cerca de 150 kDa ou um polipeptídeo de SEMA4D solúvel de cerca de 120 kDa (comumente referido como sSEMA4D). Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos uma CDR de cadeia pesada ou leve de uma molécula de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos duas CDRs a

partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos três CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos quatro CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos cinco CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em uma outra forma de realização, uma molécula de ligação da invenção compreende pelo menos seis CDRs a partir de uma ou mais moléculas de anticorpo.

[030]A presente invenção é dirigida a um método para promover neurogênese em um indivíduo que apresenta transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC, compreendendo administrar ao indivíduo uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo. A menos que especificamente se refira aos anticorpos de comprimento total, tais como anticorpos de ocorrência natural, o termo “anticorpo anti-SEMA4D” abrange anticorpos de comprimento total, assim como fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, análogos ou derivados de tais anticorpos, por exemplo, anticorpo de ocorrência natural ou moléculas de imunoglobulina ou moléculas de anticorpo construídas ou fragmentos que se ligam ao antígeno em uma maneira similar às moléculas de anticorpo.

[031]Conforme usado neste relatório, anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” incluem anticorpos que apresentam a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados a partir de bibliotecas de imunoglobulina humana ou a partir de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, conforme descrito abaixo e, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.939.598 por Kucherlapati

et al. Os anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também incluem anticorpos compreendendo pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, ou pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve, onde os domínios variáveis têm a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis da imunoglobulina humana.

[032] Os anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também incluem anticorpos “humanos” ou “completamente humanos”, conforme descrito acima, que compreendem, consistem essencialmente de, ou consistem de variantes (incluindo derivados) das moléculas de anticorpo (por exemplo, as regiões VH e/ou regiões VL) descritas neste relatório, tais anticorpos ou fragmentos dos mesmos se ligam imuno especificamente a um polipeptídeo de SEMA4D ou fragmento ou variante do mesmo. Técnicas padrão conhecidas àqueles de habilidade na técnica podem ser usadas para introduzir mutações na sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-SEMA4D humano, incluindo, mas não limitadas à mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR que resultam em substituições de aminoácidos. Preferivelmente, as variantes (incluindo derivados) codificam menos do que 50 substituições de aminoácidos, menos do que 40 substituições de aminoácidos, menos do que 30 substituições de aminoácidos, menos do que 25 substituições de aminoácidos, menos do que 20 substituições de aminoácidos, menos do que 15 substituições de aminoácidos, menos do que 10 substituições de aminoácidos, menos do que 5 substituições de aminoácidos, menos do que 4 substituições de aminoácidos, menos do que 3 substituições de aminoácidos, ou menos do que 2 substituições de aminoácidos em relação à região VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, região VL, VLCDR1, VLCDR2 ou VLCDR3 de referência.

[033] Em certas formas de realização, as substituições de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas, debatidas abaixo. Alternativamente, as mutações podem ser aleatoriamente introduzidas ao longo de ou em parte da se-

quência codificante, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados quanto à atividade biológica para identificar mutantes que conservam a atividade (por exemplo, a capacidade de ligação a um polipeptídeo de SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou humana e de murino). Tais variantes (ou derivados da mesma) de anticorpos “humanos” ou “completamente humanos” também podem ser referidas como anticorpos humanos ou completamente humanos que são “otimizados” ou “otimizados para ligação ao antígeno” e incluem anticorpos que têm afinidade ao antígeno aperfeiçoada.

[034]Os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” são permutavelmente usados neste relatório. Um anticorpo ou imunoglobulina compreende pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, e normalmente compreende pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve. Estruturas de imunoglobulina básicas em sistemas de vertebrados são relativamente bem entendidas. Veja, por exemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[035]Conforme usado neste relatório, o termo “imunoglobulina” compreende várias classes amplas de polipeptídeos que podem ser bioquimicamente distinguidas. Aqueles habilitados na técnica avaliarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) com algumas subclasses entre elas (por exemplo, γ 1 a γ 4). É a natureza desta cadeia que determina a “classe” do anticorpo como IgG, IgM, IgA IgG ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulina (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. são bem caracterizadas e são conhecidas para conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma destas classes e isotipos são facilmente discerníveis ao técnico habilitado, tendo em vista a presente divulgação e, conseqüentemente, estão no escopo da presente invenção. Todas as classes de imunoglobulina estão claramente no escopo da presente invenção, a debate seguinte, em geral, será dirigido à

classe IgG de moléculas de imunoglobulina. Com respeito à IgG, uma molécula de imunoglobulina padrão compreende dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos com peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, e dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos com peso molecular de 53.000 a 70.000. As quatro cadeias são tipicamente ligadas por ligações dissulfeto em uma configuração “Y”, em que as cadeias leves suportam as cadeias pesadas iniciando na boca do “Y” e continuando através da região variável.

[036]As cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda (κ , λ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada com uma cadeia leve kappa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas são covalentemente ligadas, e as porções da “causa” das duas cadeias pesadas são ligadas por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente construídas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos conduzidas a partir de um N-terminal nas extremidades ramificadas da configuração Y até o C-terminal no fundo de cada cadeia.

[037]As cadeias leves e pesadas são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos “constante” e “variável” são funcionalmente usados. Neste respeito, será avaliado que os domínios variáveis das porções de cadeia leve (VL ou VK) e pesada (VH) determinam o reconhecimento e especificidade do antígeno. Reciprocamente, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes, tais como secreção, mobilidade através da placenta, ligação ao receptor de Fc, ligação ao complemento e semelhantes. Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta, conforme eles se tornam mais distantes do sítio de ligação ao antígeno ou terminal amino do anticorpo. A porção N-terminal é uma região variável e na porção C-terminal é uma região constante; os domínios CH3 e CL realmente compreendem o terminal carbóxi da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[038]Conforme indicado acima, a região variável permite que o anticorpo reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítomos em antígenos. Isto é, o domínio VL e domínio VH, ou subconjunto das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dentro destes domínios variáveis, de um anticorpo são combinados para formar a região variável que define um sítio de ligação ao antígeno tridimensional. Esta estrutura de anticorpo quaternária forma o sítio de ligação ao antígeno presente na extremidade de cada ramo do Y. Mais especificamente, o sítio de ligação ao antígeno é definido por três CDRs em cada uma das cadeias de VH e VL. Em alguns exemplos, por exemplo, certas moléculas de imunoglobulina derivadas da espécie de camélídeos ou construídas com base em imunoglobulinas de camélídeos, uma molécula de imunoglobulina completa pode consistir de cadeias pesadas apenas, sem cadeias leves. Veja, por exemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 3(55:446 - 448 (1993).

[039]Em anticorpos de ocorrência natural, as seis “regiões determinantes de complementaridade” ou “CDRs” presentes em cada domínio de ligação ao antígeno são sequências curtas, não contíguas de aminoácidos que estão especificamente posicionadas para formar o domínio de ligação ao antígeno, conforme o anticorpo assume sua configuração tridimensional em um meio aquoso. O restante dos aminoácidos nos domínios de ligação ao antígeno, referidos como regiões de “estrutura”, mostram menos variabilidade intermolecular. As regiões de estrutura adotam largamente uma conformação de folha β e as CDRs formam alças que se conectam, e, em alguns casos, formam parte da estrutura de folha β . Assim, as regiões de estrutura atuam para formar um andaime que fornece posicionamento das CDRs na orientação correta através de interações entre cadeias e não covalentes. O domínio de ligação ao antígeno formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítomo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente do anticorpo a seu epítomo cognato. Os aminoáci-

dos que compreendem as CDRs e as regiões de estrutura, respectivamente, podem ser facilmente identificados para qualquer domínio variável de cadeia pesada ou leve fornecido por uma pessoa de habilidade comum na técnica, visto que eles foram precisamente definidos (veja abaixo).

[040]No caso onde existem duas ou mais definições de um termo que é usado e/ou aceito na técnica, a definição do termo, conforme usado neste relatório, é intencionado a incluir todos os tais significados, a menos que explicitamente estabelecido ao contrário. Um exemplo específico é o uso do termo “região determinante de complementaridade” (“CDR”) para descrever os sítios de combinação ao antígeno não contíguos encontrados na região variável dos polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Esta região particular foi descrita por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” e por Chothia e Lesk, J Mol. Biol. 795:901 - 917 (1987), que são incorporados neste relatório como referência, onde as definições incluem sobreposições ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparadas umas com as outras. Não obstante, a aplicação da definição para se referir a uma CDR de um anticorpo ou variantes do mesmo é intencionada a estar no escopo do termo, conforme definido e usado neste relatório. Os resíduos de aminoácidos apropriados que abrangem as CDRs definidas por cada uma das referências citadas acima são apresentados abaixo na Tabela 1 como uma comparação. Os números do resíduo exatos que abrangem uma CDR particular variarão, dependendo da sequência e tamanho da CDR. Aqueles habilitados na técnica podem determinar rotineiramente que os resíduos compreendem uma CDR particular dada a sequência de aminoácidos da região variável do anticorpo.

Tabela 1. Definições de CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58

VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹A numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 está de acordo com as convenções de numeração apresentadas por Kabat et al. (veja abaixo)

[041]Kabat *et al.* também definiram um sistema de numeração para sequências de domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode inequivocamente determinar este sistema de “numeração de Kabat” a qualquer sequência de domínio variável, sem depender de quaisquer dados experimentais além da sequência por si só. Conforme usado neste relatório, “numeração de Kabat” se refere ao sistema de numeração apresentado por Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest”. A menos que de outro modo especificado, as referências à numeração de posições de resíduo de aminoácidos específicas em um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo da presente invenção estão de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

[042]Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados do mesmo da invenção incluem, mas não são limitados a anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia única, fragmentos de ligação ao epítipo, por exemplo, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadeia única (scFv), Fvs ligado a dissulfeto (sdFv), fragmentos compreendendo um domínio VL ou VH, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para anticorpos anti-SEMA4D divulgados neste relatório). As moléculas de ScFv são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.892.019. A imunoglobulina ou moléculas de anticorpo

da invenção podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, etc.) ou subclasse da molécula de imunoglobulina.

[043]Conforme usado neste relatório, o termo “porção de cadeia pesada” inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Em certas formas de realização, um polipeptídeo compreendendo uma porção de cadeia pesada compreende pelo menos um entre: um domínio VH, um domínio CH1, um domínio da dobradiça (por exemplo, região da dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3 ou uma variante ou fragmento do mesmo. Por exemplo, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode compreender uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio da dobradiça, e um domínio CH2; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1 e um domínio CH3; uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio da dobradiça, e um domínio CH3, ou uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio da dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Em uma outra forma de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma cadeia de polipeptídeos compreendendo um domínio CH3. Além disso, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode ser desprovido de pelo menos uma porção de um domínio CH2 (por exemplo, todo ou parte de um domínio CH2). Conforme apresentado acima, será entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica que estes domínios (por exemplo, as porções de cadeia pesada) podem ser modificados, tal que eles variam na sequência de aminoácidos a partir da molécula de imunoglobulina de ocorrência natural.

[044]Em certos anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos divulgados neste relatório, as porções de

cadeia pesada de uma cadeia de polipeptídeos de um multímero são idênticas àquelas em uma segunda cadeia de polipeptídeos do multímero. Alternativamente, os monômeros contendo porção de cadeia pesada da invenção não são idênticos. Por exemplo, cada monômero pode compreender um sítio de ligação ao alvo diferente, formando, por exemplo, um anticorpo biespecífico.

[045]As porções de cadeia pesada de uma molécula de ligação para o uso nos métodos divulgados neste relatório podem ser derivadas de moléculas de imunoglobulina diferentes. Por exemplo, uma porção de cadeia pesada de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH1 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região da dobradiça derivada de uma molécula de IgG3. Em um outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma região da dobradiça derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Em um outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

[046]Conforme usado neste relatório, o termo “porção de cadeia leve” inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina, por exemplo, uma cadeia leve capa ou lambda. Preferivelmente, a porção de cadeia leve compreende pelo menos um entre um domínio VL ou CL.

[047]Anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos divulgados neste relatório podem ser descritos ou especificados em termos do(s) epítipo(s) ou porção(s) de um antígeno, por exemplo, um polipeptídeo alvo divulgado neste relatório (por exemplo, SEMA4D) aos quais eles reconhecem ou se ligam especificamente. A porção de um polipeptídeo alvo que interage especificamente com o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo é um “epítipo” ou um “determinante antigênico”. Um polipeptídeo alvo pode compreender um epítipo único, mas, tipicamente, compreende pelo menos dois epí-

topos, e pode incluir qualquer número de epítomos, dependendo do tamanho, conformação e tipo de antígeno. Além disso, deve ser observado que um “epítomo” em um polipeptídeo alvo pode ser ou pode incluir elementos não polipeptídicos, por exemplo, um epítomo pode incluir uma cadeia lateral de carboidrato.

[048]O tamanho mínimo de um epítomo de peptídeo ou polipeptídeo para um anticorpo é considerado ter cerca de quatro a cinco aminoácidos. Epítomos de peptídeo ou polipeptídeo, preferivelmente, contêm pelo menos sete, mais preferivelmente, pelo menos nove e, mais preferivelmente, entre pelo menos cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Visto que um CD pode reconhecer um peptídeo ou polipeptídeo antigênico em sua forma terciária, os aminoácidos compreendendo um epítomo não precisam ser contíguos, e, em alguns casos, ainda podem não estar na mesma cadeia de peptídeos. Um epítomo de peptídeo ou polipeptídeo reconhecido por anticorpos anti-SEMA4D da presente invenção pode conter uma sequência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferivelmente, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25 ou entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos contíguos ou não contíguos de SEMA4D.

[049]“Especificamente se liga a”, em geral, significa que um anticorpo se liga a um epítomo por intermédio de seu domínio de ligação ao antígeno, e que a ligação exige alguma complementaridade entre o domínio de ligação ao antígeno e o epítomo. De acordo com esta definição, um anticorpo “se liga especificamente” a um epítomo quando ele se liga a tal epítomo, por intermédio de seu domínio de ligação ao antígeno mais facilmente do que se ligaria a um epítomo aleatório e não relacionado. O termo “especificidade” é usado neste relatório para qualificar a afinidade relativa pela qual um certo anticorpo se liga a um certo epítomo. Por exemplo, pode ser considerado que anticorpo “A” tem uma especificidade maior para um dado epítomo em relação ao anticorpo “B”, ou o anticorpo “A” pode se ligar ao epítomo “C” com uma

especificidade maior em relação àquela para o epítopo “D” relacionado.

[050]“Preferencialmente se liga a”, significa que o anticorpo se liga especificamente a um epítopo mais facilmente do que se ligaria a um epítopo relacionado, similar, homólogo ou análogo. Assim, um anticorpo que “preferencialmente se liga” a um dado epítopo, provavelmente, se ligaria a tal epítopo em relação a um epítopo relacionado, ainda que tal anticorpo possa reagir de forma cruzada com o epítopo relacionado.

[051]Por meio de exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao dito primeiro epítopo com uma constante de dissociação (K_D) que é menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro antígeno preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos um ordem de magnitude menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menores do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo.

[052]Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma taxa de dissociação ($k(\text{off})$) que é menor do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menor do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Em um outro exemplo não limitante, um anticorpo pode se ligar a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menores do que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epítopo. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antíge-

no, variante ou derivado divulgado neste relatório pode se ligar a um polipeptídeo alvo divulgado neste relatório (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou humana e de murino) ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de dissociação ($k(\text{off})$) menor do que ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Mais preferivelmente, um anticorpo da invenção pode se ligar a um polipeptídeo alvo divulgado neste relatório (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou humana e de murino) ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de dissociação ($k(\text{off})$) menor do que ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

[053]Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado divulgado neste relatório pode se ligar a um polipeptídeo alvo divulgado neste relatório (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino, ou humana e de murino) ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de associação ($k(\text{on})$) maior do que ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mais preferivelmente, um anticorpo da invenção pode se ligar a um polipeptídeo alvo divulgado neste relatório (por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino ou humana e de murino) ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de associação ($k(\text{on})$) maior do que ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[054]Um anticorpo inibe competitivamente a ligação de um anticorpo referência a um dado epítipo se ele se ligar preferencialmente a tal epítipo em um grau que ele bloqueia, de alguma forma, a ligação do anticorpo de referência ao epítipo. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, ensaios ELISA de competição. Um anticorpo pode inibir competitivamente a ligação do anticorpo de referência a um dado epítipo em pelo menos 90 %, pelo menos 80 %, pelo menos 70 %, pelo menos 60 % ou pelo menos 50 %.

[055]Conforme usado neste relatório, o termo “afinidade” se refere a uma

medição da força da ligação de um epítipo individual com a CDR de uma molécula de imunoglobulina. Veja, por exemplo, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27 - 28. Conforme usado neste relatório, o termo “avidez” se refere à estabilidade global do complexo entre uma população de imunoglobulinas e um antígeno, isto é, a força de combinação funcional de uma mistura de imunoglobulina com o antígeno. Veja, por exemplo, Harlow nas páginas 29 - 34. A avidez está relacionada à afinidade das moléculas de imunoglobulina individuais na população com epítopos específicos, e também às valências das imunoglobulinas e do antígeno. Por exemplo, a interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antígeno com uma estrutura de epítipo altamente repetitiva, tal como um polímero, seria aquela de alta avidez.

[056]Os anticorpos Anti-SEMA4D ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção também podem ser descritos ou especificados em termos de sua reatividade cruzada. Conforme usado neste relatório, o termo “reatividade cruzada” se refere à capacidade de um anticorpo, específico para um antígeno, reagir com um segundo antígeno; uma medição da relação entre duas substâncias antigênicas diferentes. Assim, um anticorpo é reativo de forma cruzada se ele se liga a um epítipo, exceto aquele que induziu sua formação. O epítipo reativo de forma cruzada, em geral, contém muitas das mesmas características estruturais complementares do epítipo de indução, e, em alguns casos, pode realmente se ajustar melhor em relação ao original.

[057]Por exemplo, certos anticorpos têm algum grau de reatividade cruzada, em que eles se ligam a epítopos relacionados, mas não idênticos, por exemplo, epítopos com pelo menos 95 %, pelo menos 90 %, pelo menos 85 %, pelo menos 80 %, pelo menos 75 %, pelo menos 70 %, pelo menos 65 %, pelo menos 60 %, pelo menos 55 % e pelo menos 50 % de identidade (conforme calculado usando os métodos conhecidos na técnica e descritos neste relatório) a um epítipo de referência. Um

anticorpo pode ter pouca ou nenhuma reatividade cruzada se ele não se liga a epítopos com menos do que 95 %, menos do que 90 %, menos do que 85 %, menos do que 80 %, menos do que 75 %, menos do que 70 %, menos do que 65 %, menos do que 60 %, menos do que 55 % e menos do que 50 % de identidade (conforme calculado usando os métodos conhecidos na técnica e descritos neste relatório) a um epítipo de referência. Um anticorpo pode ser considerado “altamente específico” para um certo epítipo, se ele não se liga a qualquer outro análogo, ortólogo ou homólogo de tal epítipo.

[058] Moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos da invenção também podem ser descritos ou especificados em termos de sua afinidade de ligação a um polipeptídeo da invenção, por exemplo, SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino ou humana e de murino. Afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de dissociação ou K_d menor do que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M ou 10^{-15} M. Em certas formas de realização, a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção se liga à SEMA4D humana com uma K_d de cerca de 5×10^{-9} a cerca de 6×10^{-9} . Em uma outra forma de realização, a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção, se liga à SEMA4D de murino com uma K_d de cerca de 1×10^{-9} a cerca de 2×10^{-9} .

[059] Conforme usado neste relatório, o termo “anticorpo quimérico” será mantido para significar qualquer anticorpo em que a região ou sítio imunorreativo é obtido ou derivado de uma primeira espécie e a região constante (que pode ser intacta, parcial ou modificada, de acordo com a presente invenção) é obtida a partir de

uma segunda espécie. Em formas de realização preferidas, a região ou sítio de ligação alvo será a partir de uma fonte não humana (por exemplo, de camundongo ou primata) e a região constante é humana.

[060]Conforme usado neste relatório, o termo “anticorpo construído” se refere a um anticorpo em que o domínio variável na cadeia pesada ou leve ou nas duas é alterada em pelo menos substituição parcial de uma ou mais CDRs a partir de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, através de substituição de região de estrutura parcial e modificação de sequência. Embora as CDRs possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe ou ainda subclasse do anticorpo a partir do qual as regiões de estrutura são derivadas, é considerado que as CDRs serão derivadas de um anticorpo de classe diferente e, preferivelmente, a partir de um anticorpo a partir de uma espécie diferente. Um anticorpo construído, em que uma ou mais CDRs “doadoras” a partir de um anticorpo não humano de especificidade conhecida é enxertado em uma região de estrutura de cadeia pesada ou leve humana, é referido neste relatório como um “anticorpo humanizado”. Pode não ser necessário substituir todas as CDRs com as CDRs completas a partir do domínio variável doador para transferir a capacidade de ligação ao antígeno de um domínio variável a um outro. Particularmente, pode ser apenas necessário transferir tais resíduos que são necessários para manter a atividade do sítio de ligação ao alvo.

[061]Ainda é reconhecido que as regiões de estrutura no domínio variável em uma cadeia pesada ou leve, ou em ambas, de um anticorpo humanizado podem compreender somente resíduos de origem humana, caso em que estas regiões de estrutura do anticorpo humanizado são referidas como “regiões de estrutura completamente humanas” (por exemplo, MAb VX 15/2503, divulgado na Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº US 2010/0285036 A1 como MAb 2503, integralmente incorporada neste relatório como referência). Alternativamente, um ou mais resíduos das regiões de estrutura do domínio variável doador podem ser construídos na posição

correspondente das regiões de estrutura humana de um domínio variável em uma cadeia pesada ou leve, ou em ambas, de um anticorpo humanizado, se necessário, para manter ligação apropriada ou para acentuar a ligação ao antígeno de SEMA4D. Uma região de estrutura humana que foi construída desta forma, assim, compreenderia uma mistura de resíduos de estrutura humana e de doadores, e é referida neste relatório como uma “região de estrutura parcialmente humana”.

[062]Por exemplo, a humanização de um anticorpo anti-SEMA4D pode ser essencialmente realizada após o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, Nature 527:522 - 525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 - 327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239:1534 - 1536 (1988)), através da substituição das CDRs ou sequências de CDR do roedor ou roedor mutante para as sequências correspondentes de um anticorpo anti-SEMA4D humano. Veja também as Patentes U.S. Nºs 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205; incorporadas neste relatório como referência. O anticorpo anti-SEMA4D humanizado resultante compreenderia pelo menos uma CDR de roedor ou roedor mutante nas regiões de estrutura completamente humanas do domínio variável da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo humanizado. Em alguns exemplos, os resíduos nas regiões de estrutura de um ou mais domínios variáveis do anticorpo anti-SEMA4D humanizado são substituídos por resíduos não humanos correspondentes (por exemplo, de roedor) (veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nºs 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370), caso em que o anticorpo anti-SEMA4D humanizado resultante compreenderia regiões de estrutura parcialmente humanas no domínio variável da cadeia pesada e/ou leve.

[063]Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo (por exemplo, para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente pelo menos um, e, tipicamente dois domínios variáveis, em

que todas ou substancialmente todas as CDRs correspondem aqueles de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões de estrutura são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja Jones *et al.*, Nature 357:522 - 525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 552:323 - 329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol 2:593 - 596 (1992); neste relatório incorporados como referência. Consequentemente, tais anticorpos “humanizados” podem incluir anticorpos em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente a partir de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos da CDR e, possivelmente, alguns resíduos da estrutura são substituídos por resíduos a partir de sítios análogos em anticorpos de roedor. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nºs 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Veja também a Patente U.S. Nº 6.180.370 e a Publicação Internacional Nº WO 01/27160, onde os anticorpos humanizados e técnicas para produzir anticorpos humanizados que apresentam afinidade melhorada para um antígeno pré-determinado são divulgados.

II. CÉLULAS TRONCO/PRECURSORAS NEURAIS OU CÉLULAS TRONCO/PROGENITORAS NEURAIS (NSPCs)

[064]A neurogênese se refere, em geral, à produção de novos neurônios. Tradicionalmente, acredita-se que a neurogênese ocorra apenas durante os períodos embrionários e pós-natais prematuros e não tenha papel significativo no cérebro do adulto. Nos últimos anos, entretanto, foi avaliado que a neurogênese ocorre em regiões selecionadas do cérebro do mamífero adulto e pode ser estimulada nestas, assim como em outras regiões em resposta à lesão.

[065]Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e sistema ner-

vosso periférico, células troncos neurais se proliferam e se dividem em células progenitoras que eventualmente se diferenciam em tipos de células que compõem o cérebro do adulto. Células derivadas do tubo neural dão origem a neurônios e células da guia do SNC, enquanto as células derivadas da crista neural dão origem às células do sistema nervoso periférico (SNP).

[066]Células tronco/progenitoras neurais e seu uso terapêutico foram descritas na técnica, por exemplo, veja a Patente U.S. Nº 6.638.501, Bjorason *et al.*; Patente U.S. Nº 6.541.255, Snyder *et al.*; Patente U.S. Nº 6.498.018, Carpenter; Pedido de Patente U.S. 20020012903, Goldman *et al.*; Palmer *et al.* (2001) Nature 411(6833):42 - 3; Palmer *et al.* (1997) Mol Cell Neurosci. 8(6):389 - 404; Svendsen *et al.* (1997) Exp. Neurol. 148(1): 135 - 46 e Shihabuddin (1999) Mol Med Today. 5(11):474 - 80. Métodos para isolamento e cultura de células tronco neurais também são conhecidos na técnica, veja a Patente U.S. Nº 6.777.233; Patente U.S. Nº 6.497.872 e Pedido de Patente U.S. 20030143737A1. Todas estas referências são especificamente incorporadas como referência.

[067]Células tronco e precursoras neurais participam do desenvolvimento normal através da migração ao longo das vias migratórias bem estabelecidas às regiões do SNC disseminadas, diferenciação nos tipos de células em resposta às pistas microambientais e intercalação com progenitores hospedeiros e sua progênie. Células tronco neurais humanas são capazes de expressar transgenes estranhos *in vivo* nestas localizações disseminadas. Como tal, estas células podem ser potencialmente usadas para tratar uma variedade de condições que afetam o SNC, incluindo transtornos degenerativos (por exemplo, doença de Alzheimer e Parkinson), lesão cerebral aguda (por exemplo, acidente vascular cerebral, lesão da cabeça, paralisia cerebral) e um grande número de disfunções do SNC (por exemplo, depressão, epilepsia e esquizofrenia).

[068]Nos últimos anos, a doença neurodegenerativa se tornou uma preocu-

pação importante, devido ao aumento da população idosa que está em maior risco para estes transtornos. Estas doenças, que incluem doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson, foram ligadas à degeneração de células neurais, em particular, localizações do SNC, levando à incapacidade de estas células ou a região do cérebro realizarem sua função intencionada.

[069]A degeneração em uma região do cérebro conhecida como os gânglios basais pode levar às doenças com vários sintomas cognitivos e motores, dependendo da localização exata. Os gânglios basais consistem de muitas regiões separadas, incluindo o estriado (que consiste do caudado e putâmen), o globo pálido, a substância negra, substância inominada, paládio ventral, núcleo basal de Meynert, área tegmental ventral e o núcleo subtalâmico.

[070]Na doença de Alzheimer, por exemplo, existe degeneração celular do cérebro anterior e córtex cerebral. Além disso, parece ser degeneração localizada em uma área dos gânglios basais, o núcleo basal de Meynert. Este núcleo normalmente envia projeções colinérgicas ao córtex cerebral que são pensadas participar nas funções cognitivas, incluindo a memória. Na coreia de Huntington, por outro lado, existe degeneração de neurônios no estriado, o que leva a movimentos de contração muscular involuntários no hospedeiro. Na doença de Parkinson, além disso, a degeneração é observada em uma outra área dos gânglios basais, a parte compacta da substância negra. Esta área normalmente envia conexões dopaminérgicas ao estriado dorsal que são importantes na regulação do movimento. A terapia para doença de Parkinson tem o objetivo de restaurar a atividade dopaminérgica a este circuito. A degeneração de outras regiões dos gânglios basais também é possível. Por exemplo, a degeneração de uma pequena região chamada o núcleo subtalâmico está associada com movimento rápidos violentos das extremidades em uma condição chamada balismo, enquanto a degeneração no putâmen e globo pálido está as-

sociada com uma condição de movimentos de contração lentos ou atetose.

[071]Além das doenças neurodegenerativas, as lesões cerebrais agudas frequentemente resultam na perda de células neurais, funcionamento inadequado da região do cérebro afetada e anormalidades de comportamento subsequentes. Além da perda celular, um indivíduo pode sofrer de um funcionamento anormal de células neurais existentes. Isto pode ocorrer devido à ativação de neurônios inadequada ou à síntese, liberação e processamento anormais de neurotransmissores. Estas disfunções podem ser o resultado de transtornos bem estudados e caracterizados, tais como depressão e epilepsia, ou transtornos menos entendidos, tais como neurose e psicose. Outras formas de defeito neurológico podem ocorrer como um resultado de degeneração neural, tal como esclerose lateral amiotrófica e paralisia cerebral, ou como um resultado de trauma do SNC mais agudo, tal como aquele que ocorre em lesão cerebral traumática (TBI) e acidente vascular cerebral.

III. DESCRIÇÃO DO POLIPEPTÍDEO ALVO

[072]Conforme usado neste relatório, os termos “semaforina-4D”, “SEMA4D” e “polipeptídeo de SEMA4D” são permutavelmente usados, como são “SEMA4D” e “Sema4D”. Em certas formas de realização, SEMA4D é expressada na superfície de ou secretada por uma célula. Em uma outra forma de realização, SEMA4D é ligada à membrana. Em outras formas de realização, SEMA4D é solúvel, por exemplo, sSEMA4D. Em outras formas de realização, SEMA4D pode incluir uma SEMA4D de comprimento total ou um fragmento da mesma, ou um polipeptídeo variante de SEMA4D, em que o fragmento de SEMA4D ou polipeptídeo variante de SEMA4D conserva algumas ou todas as propriedades funcionais da SEMA4D de comprimento total.

[073]A proteína de SEMA4D de comprimento total humana é uma proteína transmembrana homodimérica que consiste de duas cadeias de polipeptídeos de 150 kDa. SEMA4D pertence à família da semaforina de receptores de superfície ce-

lular e também é referida como CD100. SEMA4D/Sema4D humana e de camundongo são proteoliticamente clivadas a partir de sua forma transmembrana para gerar formas solúveis de 120 kDa, indicando a existência de duas isoformas de Sema4D (Kumanogoh *et al.*, J. Cell Science 11 <5(7):3464 (2003)). As semaforinas consistem de proteínas solúveis e ligadas à membrana que foram originalmente definidas como fatores de orientação axonal durante o desenvolvimento, as quais desempenham um papel importante no estabelecimento de conexões precisas entre os neurônios e seu alvo apropriado. Estruturalmente considerada uma semaforina classe IV, a SEMA4D consiste de uma sequência sinal amino-terminal, seguido por um domínio “Sema” característico, que contém 17 resíduos de cisteína conservados, um domínio do tipo Ig, um estiramento rico em lisina, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplásmica.

[074]Cada cadeia de polipeptídeos de SEMA4D inclui uma sequência sinal de cerca de 13 aminoácidos, seguido por um domínio de semaforina de cerca de 512 aminoácidos, um domínio do tipo imunoglobulina (do tipo Ig) de cerca de 65 aminoácidos, um estiramento rico em lisina de 104 aminoácidos, uma região transmembrana hidrofóbica de cerca de 19 aminoácidos e uma cauda citoplásmica de 110 aminoácidos. Um sítio consenso para a fosforilação de tirosina na cauda citoplásmica suporta a associação prognosticada de SEMA4D com uma tirosina cinase (Schlossman, *et al.*, Eds. (1995) Leucocyte Typing V (Oxford University Press, Oxford).

[075]É conhecido que SEMA4D apresenta pelo menos três receptores: Plexin-B1, Plexin-B2 e CD72. Um dos receptores, Plexin-B1, é expressado em tecidos não linfoides e foi mostrado apresentar um receptor de alta afinidade (1 nM) para SEMA4D (Tamagnone *et al.*, Cell 99:71- 80 (1999)). Em certas formas de realização, as células endoteliais expressam Plexin-B1. O estímulo de SEMA4D da sinalização de Plexin-B1 foi mostrado induzir o colapso do cone de crescimento de neurônios, e

induzir o colapso de extensão do processo e apoptose de oligodendrócitos (Giraudon *et al.*, J Immunol. 772:1246 - 1255 (2004); Giraudon *et al.*, NeuroMolecular Med. 7:207 - 216 (2005)). Depois da ligação à SEMA4D, a sinalização de Plexin-B1 medeia a inativação de R-Ras, levando a uma diminuição na ligação mediada por integrina à matriz extracelular, e também pode resultar na ativação de RhoA, levando ao colapso celular através da reorganização do citoesqueleto. Veja Kruger *et al.*, Nature Rev. Mol. Cell Biol. (5:789 - 800 (2005); Pasterkamp, TRENDS in Cell Biology 75:61 - 64 (2005)). Plexin-B2 tem uma afinidade intermediária para SEMA4D e um relato recente indica que PLXNB2 é expressada em queratinócitos e ativa células T $\gamma\delta$ SEMA4D-positivas para contribuir ao reparo epitelial (Witherden *et al.*, Immunity. 24 de Ago 2012;37(2):314 - 25).

[076]Em tecidos linfoides, CD72 é utilizado como um receptor de SEMA4D de baixa afinidade (300 nM) (Kumanogoh *et al.*, Immunity 75:621 - 631 (2000)). As células B e APCs expressam CD72 e anticorpos anti-CD72 têm muitos dos mesmos efeitos de sSEMA4D, tais como intensificação de respostas de células B induzidas por CD40 e irradiação de células B de CD23. É considerado que CD72 atua como um regulador negativo de respostas de células B através do recrutamento da tirosina fosfatase SHP-1, que pode estar associada com diversos receptores inibitórios. A interação de SEMA4D com CD72 resulta na dissociação de SHP-1 e na perda deste sinal de ativação negativo. Foi mostrado que SEMA4D promove o estímulo de células T e agregação e sobrevivência de células B *in vitro*. A adição de células que expressam SEMA4D ou sSEMA4D acentua a proliferação de células B induzida por CD40 e produção de imunoglobulina *in vitro* e acelera as respostas do anticorpo *in vivo* (Ishida *et al.*, Inter. Immunol. 75:1027 - 1034 (2003); Kumanogoh e H. Kikutani, Trends in Immunol 22:670 - 676 (2001)). A sSEMA4D acentua a maturação induzida por CD40 de DCs, incluindo suprarregulação de moléculas coestimulantes e secreção aumentada de IL-12. Além disso, sSEMA4D pode inibir a migração de células

imunes, que pode ser revertida através da adição do bloqueio de anticorpos anti-SEMA4D (Elhabazi *et al.*, J Immunol. 166:4341 - 4347 (2001); Delaire *et al.*, J. Immunol 166:4348 - 4354 (2001)).

[077]Sema4D é expressada em altos níveis em órgãos linfoides, incluindo o baço, timo e linfonodos, e em órgãos não linfoides, tais como o cérebro, coração e rim. Em órgãos linfoides, Sema4D é abundantemente expressada em células T em repouso, mas apenas fracamente expressada em células B em repouso e células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DCs). A ativação celular aumenta a expressão de superfície de SEMA4D, assim como a geração de SEMA4D solúvel (sSEMA4D).

[078]A expressão padrão de SEMA4D sugere que a mesma desempenha um papel fisiológico assim como patológico importante no sistema imune. Foi mostrado que SEMA4D promove a ativação, agregação e sobrevivência de células B; acentua a proliferação induzida por CD40 e produção de anticorpos; acentua a resposta do anticorpo aos antígenos dependentes de células T; aumenta a proliferação de células T; acentua a maturação de células dendríticas e capacidade de estimular células T; e é diretamente implicada na desmielinização e degeneração axonal (Shi *et al.*, Immunity 75:633 - 642 (2000); Kumanogoh *et al.*, J Immunol 7(59:1 175 - 1 181 (2002); e Watanabe *et al.*, J Immunol 7(57:4321 - 4328 (2001)).

[079]Camundongos nocaute SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) forneceram evidência adicional de que SEMA4D desempenha um papel importante nas respostas humorais e imunes celulares. Não existem anormalidades conhecidas de tecidos não linfoides em camundongos SEMA4D^{-/-}. Células dendríticas (DCs) a partir dos camundongos SEMA4D^{-/-} têm capacidade aloestimulante deficiente e mostram defeitos na expressão de moléculas coestimulantes, que podem ser resgatadas pela adição de sSEMA4D. Os camundongos deficientes em SEMA4D (SEMA4D^{-/-}) não conseguem desenvolver encefalomielite autoimune experimental induzida por peptídeo da glico-

proteína mielina-oligodendrócito, pois as células T específicas da glicoproteína mielina-oligodendrócito são deficientemente geradas na ausência de SEMA4D (Kumanogoh *et al.*, J Immunol 7(59): 1 175 - 1 181 (2002)). Uma quantidade significativa de SEMA4D solúvel também é detectada nos soros de camundongos MRL/lpr propensos à autoimunidade (modelo de doenças autoimunes sistêmicas, tais como SLE), mas não em camundongos normais. Além disso, os níveis de sSEMA4D se correlacionam com níveis de auto-anticorpos e aumentam com a idade (Wang *et al.*, Blood 97:3498 - 3504 (2001)). Foi mostrado que SEMA4D solúvel também se acumula no fluido cérebro-espinhal e soros de pacientes com doença desmielinizantes, e sSEMA4D induz a apoptose de precursores neurais pluripotentes humanos (células Dev), e inibem a extensão do processo e induzem a apoptose de oligodendrócitos de rato *in vitro* (Giraudon *et al.*, J Immunol 772(2):1246 - 1255 (2004)). Esta apoptose foi bloqueada por um MAb anti-SEMA4D.

IV. ANTICORPOS ANTI-SEMA4D

[080]Os anticorpos que se ligam à SEMA4D foram descritos na técnica. Veja, por exemplo, Publicações U.S. N^{os} 2008/0219971 A1, U.S. 2010/0285036 A1 e U.S. 2006/0233793 A1, Pedidos de Patente Internacionais WO 93/14125, WO 2008/100995 e WO 2010/129917, e Herold *et al.*, Int. Immunol. 7(1): 1 - 8 (1995), cada um dos quais é integralmente incorporado neste relatório como referência.

[081]A invenção, em geral, se refere a um método para promover a neurogênese em um indivíduo que apresenta transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC, por exemplo, um paciente humano, compreendendo a administração de um anticorpo que se liga especificamente à SEMA4D, ou um fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo. Em certas formas de realização, o anticorpo bloqueia a interação de SEMA4D com um ou mais de seus receptores, por exemplo, Plexin-B1. Os anticorpos Anti-SEMA4D que apresentam estas propriedades podem ser usados nos

métodos fornecidos neste relatório. Os anticorpos que podem ser usados incluem, mas não são limitados a MAb VX15/2503, 67 e 76 e fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos que são completamente descritos no U.S. 2010/0285036 A1. Os anticorpos adicionais que podem ser usados nos métodos fornecidos neste relatório incluem os anticorpos BD16 e BB18 descritos no U.S. 2006/0233793 A1, assim como fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos; ou qualquer um entre MAb 301, MAb 1893, MAb 657, MAb 1807, MAb 1656, MAb 1808, Mab 59, MAb 2191, MAb 2274, MAb 2275, MAb 2276, MAb 2277, MAb 2278, MAb 2279, MAb 2280, MAb 2281, MAb 2282, MAb 2283, MAb 2284 e MAb 2285, assim como quaisquer fragmentos, variantes ou derivados dos mesmos, conforme descrito no U.S. 2008/0219971 A1. Em certas formas de realização, um anticorpo anti-SEMA4D para o uso nos métodos fornecidos neste relatório se liga à SEMA4D humana, de murino ou humana e de murino. Também são úteis os anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo conforme qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados e/ou anticorpos que inibem competitivamente qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados.

[082]As sequências de aminoácidos dos genes VH e VK de MAb 67 são mostradas abaixo com as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 sublinhadas.

VH de MAb 67:

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHWWKOSPENSLEWIGQ
INPTTGGASYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRYYYGRHFD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

VK de MAb 67:

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPL
LIYA
ASNLESGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEI
K (SEQ ID NO: 2)

[083]As sequências de aminoácidos de VH (H2160) e VK (L553) do MAb 67 humanizado (“MAb VX15/2503”) são mostradas abaixo com as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 sublinhadas.

Sequência de H2160:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFSDYYMHWVRQAPGQGLEWM
GQINPTTGGASYNQKFKGKATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRH
FDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Sequência de L553:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPL
LIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGQGT
KLEIK (SEQ ID NO: 4)

[084]Em certas formas de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório tem uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 88 %, cerca de 89 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 % ou cerca de 95 % de identidade de sequência à sequência de aminoácidos para uma molécula do anticorpo de referência anti-SEMA4D, por exemplo, VX15/2503 e 67 descritos acima. Em uma outra forma de realização, a molécula de ligação compartilha pelo menos cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou 100 % de identidade de sequência a um anticorpo de referência.

[085]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca

de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou idêntica à CDR1, CDR2 ou CDR3 da SEQ ID NO: 1 ou 3.

[086]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou idêntica à SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7.

[087]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio VH), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VH tem uma sequência de aminoácidos idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, à SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7.

[088]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio VH que tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3, em que um anticorpo anti-SEMA4D compreendendo o domínio VH codificado se liga específica ou preferencialmente à SEMA4D.

[089]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fra-

gmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina (domínio VL), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou idêntica à CDR1, CDR2 ou CDR3 da SEQ ID NO: 2 ou 4.

[090]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina (domínio VL), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou idêntica à SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, ou SEQ ID NO: 10.

[091]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina (domínio VL), onde pelo menos uma entre as CDRs do domínio VL tem uma sequência de aminoácidos idêntica, exceto para 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácidos conservativas, à SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10.

[092]Em uma outra forma de realização, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo útil nos métodos fornecidos neste relatório compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um domínio VL que tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou idêntica à SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, ou SEQ ID NO: 10.

cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou 100 % idêntica à SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4, em que um anticorpo anti-SEMA4D compreendendo o domínio VL codificado se liga específica ou preferencialmente à SEMA4D.

[093] Também incluídos para o uso nos métodos fornecidos neste relatório são polipeptídeos que codificam anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos, conforme descrito neste relatório, polinucleotídeos que codificam tais polipeptídeos, vetores que compreendem tais polinucleotídeos e células hospedeiras que compreendem tais vetores ou polinucleotídeos, todos para a produção de anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos para o uso nos métodos descritos neste relatório.

[094] Variantes biologicamente ativas adequadas dos anticorpos anti-SEMA4D da invenção podem ser usadas nos métodos da presente invenção. Tais variantes conservarão as propriedades de ligação desejadas do anticorpo anti-SEMA4D precursor. Métodos para fabricar variantes de anticorpo estão, em geral, disponíveis na técnica.

[095] Métodos para a mutagênese e alterações na sequência de nucleotídeos são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova Iorque); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:488 - 492 (1985); Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 754:367 - 382 (1987); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); Patente U.S. Nº 4.873.192; e as referências citados nos mesmos; incorporadas como referência neste relatório. Orientações quanto às substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica do polipeptídeo de interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff *et al.* (1978) no *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found.,

Washington, D.C.), páginas 345 - 352, integralmente incorporado como referência neste relatório. O modelo de Dayhoff *et al.* utiliza a matriz de similaridade de aminoácidos Point Accepted Mutation (PAM) (matriz PAM 250) para determinar as substituições de aminoácidos conservativas adequadas. Substituições conservativas, tais como a troca de um aminoácido por um outro que apresenta propriedades similares, podem ser preferidas. Exemplos de substituições de aminoácidos conservativas mostradas pela matriz PAM 250 do modelo de Dayhoff *et al.* incluem, mas não são limitados a Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln e Phe↔Trp↔Tyr.

[096]Na construção de variantes da molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, modificações de polipeptídeos de interesse são feitas, tal que as variantes continuam a possuir as propriedades desejadas, por exemplo, sendo capazes de se ligar especificamente a uma SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de murino ou humana e de murino, por exemplo, expressada na superfície de ou secretada por uma célula e tendo atividade de bloqueio de SEMA4D, conforme descrito neste relatório. Obviamente, quaisquer mutações feitas no DNA que codifica o polipeptídeo variante não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e, preferivelmente, não criarão regiões complementares que podem produzir estrutura de mRNA secundária. Veja a Publicação do Pedido de Patente EP Nº 75.444.

[097]Métodos para medir a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, uma especificidade de ligação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, incluem, mas não são limitados a ensaios de ligação competitiva padrão, ensaios para monitorar a secreção de imunoglobulina através de células T ou células B, ensaios de proliferação de células T, ensaios de apoptose, ensaios ELISA e semelhantes. Veja, por exemplo, tais ensaios divulgados no WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 75:633 - 642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immu-*

nol 769: 1175 - 1181 (2002); Watanabe *et al.*, J Immunol 767:4321 - 4328 (2001); Wang *et al.*, Blood 97:3498 - 3504 (2001); e Giraudon *et al.*, J Immunol 772(2):1246 - 1255 (2004), os quais são incorporados como referência neste relatório.

[098]Quando o caso é debatido neste relatório, se qualquer polipeptídeo particular, incluindo as regiões constantes, CDRs, domínios VH ou domínios VL divulgado neste relatório, é pelo menos cerca de 65 %, cerca de 70 %, cerca de 75 %, cerca de 80 %, cerca de 85 %, cerca de 90 %, cerca de 91 %, cerca de 92 %, cerca de 93 %, cerca de 94 %, cerca de 95 %, cerca de 96 %, cerca de 97 %, cerca de 98 %, cerca de 99 % ou ainda cerca de 100 % idêntico a um outro polipeptídeo, a % de identidade pode ser determinada usando métodos e programas/software de computador conhecidos na técnica, tais como, mas não limitados ao programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT utiliza o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482 - 489, para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Quando do uso de BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequência para determinar se uma sequência particular é, por exemplo, 95 % idêntica a uma sequência de referência, de acordo com a presente invenção, os parâmetros são ajustados, certamente, tal que a porcentagem de identidade é calculada sobre o comprimento total da sequência de polipeptídeos de referência e que espaços na homologia de até 5 % do número total de aminoácidos na sequência de referência são permitidos.

[099]Para os propósitos da presente invenção, a porcentagem na identidade de sequência pode ser determinada usando o algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman usando uma pesquisa de espaços semelhantes com um penalidade de espaço aberto de 12 e uma penalidade de extensão de espaço de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman é mostrado

em Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482 - 489. Uma variante, por exemplo, pode diferir de um anticorpo anti-SEMA4D de referência (por exemplo, MAb VX15/2503, 67 ou 76) em 1 a 15 resíduos de aminoácidos, 1 a 10 resíduos de aminoácidos, tal como 6 a 10, 5, 4, 3, 2 ou ainda 1 resíduo de aminoácido.

[0100]A região constante de um anticorpo anti-SEMA4D pode ser modificada para alterar a função efetora em diversas maneiras. Por exemplo, veja a Patente U.S. Nº 6.737.056B1 e Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2004/0132101 A1, que divulgam mutações Fc que otimizam a ligação do anticorpo aos receptores Fc.

[0101]Em certos anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos, variantes ou derivados dos mesmos úteis nos métodos fornecidos neste relatório, a porção Fc pode ser modificada para diminuir a função efetora usando técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo, a deleção ou inativação (através de mutações de ponto ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação ao receptor Fc do anticorpo modificado circulante, desse modo, aumentando a localização do tumor. Em outros casos, as modificações de região constante compatíveis com a presente invenção moderam a ligação ao complemento e, assim, reduzem a meia-vida do soro. Outras modificações da região constante podem ser usadas para modificar ligações dissulfeto ou porções de oligossacarídeo que levam em consideração a localização acentuada, devido à especificidade do antígeno ou flexibilidade do anticorpo aumentada. O perfil fisiológico, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos resultantes das modificações, tais como localização do tumor, biodistribuição e meia-vida do soro, podem ser facilmente medidos e quantificados usando técnicas imunológicas bem conhecidas sem experimentação indevida.

[0102]Anticorpos anti-SEMA4D para o uso nos métodos fornecidos neste relatório incluem derivados que são modificados, por exemplo, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo, tal que a ligação covalente não previne que o anticorpo se ligue especificamente ao seu epítipo cognato. Por exemplo, mas

não por meio de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, através de glicosilação, acetilação, pegilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma entre diversas modificações químicas pode ser realizada através de técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a clivagem química específica, acetilação, formilação, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0103]Uma “substituição de aminoácidos conservativa” é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que apresenta uma cadeia lateral com uma carga similar. Famílias de resíduos de aminoácidos que apresentam cadeias laterais com cargas similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, as mutações podem ser aleatoriamente introduzidas ao longo de toda ou parte da sequência codificante, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados quanto à atividade biológica para identificar mutantes que conservam a atividade (por exemplo, a capacidade de se ligar a um polipeptídeo anti-SEMA4D, bloquear a interação de SEMA4D com seu receptor ou promover a neurogênese em um indivíduo).

[0104]Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas em regiões de estrutura ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. Mutações introduzidas pode ser mutações silenciosas ou *missense* neutras, isto é, têm pouco ou

nenhum efeito sobre uma capacidade de o anticorpo se ligar ao antígeno. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar a utilização do códon ou aperfeiçoar uma produção do anticorpo do hibridoma. Alternativamente, mutações *missense* não neutras podem alterar uma capacidade de o anticorpo se ligar ao antígeno. Uma pessoa de habilidade na técnica seria capaz de projetar e testar moléculas mutantes com propriedades desejadas, tais como nenhuma alteração na atividade de ligação ao antígeno ou alteração na atividade de ligação (por exemplo, aperfeiçoamentos na atividade de ligação ao antígeno ou mudança na especificidade do anticorpo). Após a mutagênese, a proteína codificada pode ser rotineiramente expressada e a atividade funcional e/ou biológica da proteína codificada, (por exemplo, capacidade de se ligar imunoespecificamente a pelo menos um epítipo de um polipeptídeo de SEMA4D) pode ser determinada usando técnicas descritas neste relatório ou através de técnicas de modificação de rotina conhecidas no ramo.

[0105]Em certas formas de realização, os anticorpos anti-SEMA4D para o uso nos métodos fornecidos neste relatório compreendem pelo menos uma região determinante de complementaridade otimizada (CDR). “CDR otimizada” significa que a CDR foi modificada e otimizada para aperfeiçoar a afinidade de ligação e/ou atividade anti-SEMA4D que é comunicada a um anticorpo anti-SEMA4D compreendendo a CDR otimizada. “Atividade anti-SEMA4D” ou “atividade de bloqueio de SEMA4D” pode incluir a atividade que modula uma ou mais entre as seguintes atividades associadas com SEMA4D: ativação de células B, agregação e sobrevivência; proliferação induzida por CD40 e produção do anticorpo; resposta do anticorpo a antígenos dependentes de células T; proliferação de células T ou outra célula imune; maturação de células dendríticas; desmielinação e degeneração axonal; apoptose de precursores neurais pluripotentes e/ou oligodendrócitos; indução de migração de células endoteliais; inibição de migração de monócitos espontânea; ligação à Plexin-B1 de superfície celular ou outro receptor, ou qualquer outra associação de atividade

com SEMA4D solúvel ou SEMA4D que é expressada na superfície de células de SEMA4D+. A atividade anti-SEMA4D também pode ser atribuída a uma diminuição na incidência ou severidade de doenças associadas com a expressão de SEMA4D, incluindo, mas não limitadas a certos tipos de cânceres, incluindo linfomas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, incluindo doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), rejeições a transplantes e angiogênese invasiva. Exemplos de anticorpos otimizados com base em MAbs anti-SEMA4D de murino, BD16 e BB18, foram descritos na Publicação U.S. Nº 2008/0219971 A1, Pedido de Patente Internacional WO 93/14125 e Herold *et al.*, Int. Immunol. 7(1): 1 - 8 (1995), os quais são integralmente incorporados como referência neste relatório. As modificações podem envolver substituição de resíduos de aminoácidos dentro da CDR, tal que um anticorpo anti-SEMA4D conserva a especificidade para o antígeno de SEMA4D e tem afinidade de ligação aperfeiçoada e/ou atividade anti-SEMA4D aperfeiçoada.

[0106]Em certas formas de realização, a molécula de ligação do presente pedido, por exemplo, um anticorpo anti-SEMA4D ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, inibe a atividade de SEMA4D e/ou a interação de SEMA4D com um receptor de SEMA4D ou porção do mesmo. Em certas formas de realização, a atividade de SEMA4D inibida inclui uma ou mais entre as seguintes: ativação de células B, agregação e/ou sobrevivência; proliferação induzida por CD40 e/ou produção de anticorpo; resposta do anticorpo aos antígenos dependente de células T; proliferação de células T ou outra célula imune; maturação de células dendríticas; desmielinização e degeneração axonal; apoptose de precursores neurais pluripotentes e/ou oligodendrócitos; indução de migração de células endoteliais; inibição de migração de monócitos espontânea; dimerização de SEMA4D; ligação à Plexin-B1 de superfície celular ou outro receptor, ou qualquer outra associação de atividade com SEMA4D solúvel ou SEMA4D que é expressada na superfície de células de

SEMA4D+.

[0107]“Inibe”, conforme usado neste relatório, pode incluir bloqueio parcial ou completo, por exemplo, da ligação, atividade, função, interação ou outra característica mensurável.

V. MÉTODOS DE TRATAMENTO USANDO ANTICORPOS ANTI-SEMA4D TERAPÊUTICOS

[0108]Os métodos da invenção são dirigidos ao uso de moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos, incluindo fragmentos de ligação ao antígeno, variantes e derivados dos mesmos, para promover neurogênese em um indivíduo que apresenta transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC. O seguinte debate se refere à administração de um anticorpo anti-SEMA4D, os métodos descritos neste relatório também são aplicáveis aos fragmentos de ligação ao antígeno, variantes e derivados destes anticorpos anti-SEMA4D que conservam as propriedades desejadas dos anticorpos anti-SEMA4D da invenção, por exemplo, capazes de se ligar especificamente à SEMA4D, por exemplo, SEMA4D humana, de camundongo ou humana e de camundongo, que apresentam atividade neutralizante de SEMA4D e/ou bloqueiam a interação de SEMA4D com seu receptor, por exemplo, Plexin-B1.

[0109]Em uma forma de realização, o tratamento inclui a aplicação ou administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, conforme descrito neste relatório, a um paciente, onde o paciente tem, ou tem o risco de desenvolver transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC. Em uma outra forma de realização, o tratamento também é intencional a incluir a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a um paciente, onde o paciente tem, ou

tem o risco de desenvolver transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC.

[0110]Em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a um paciente, pode ser liberada em qualquer forma convencional, incluindo qualquer forma conhecida na técnica em que ela pode passar através da barreira sangue-cérebro (isto é, atua no lado do cérebro). Devido à interação de SEMA4D com um receptor em astrócitos, que são células residentes no cérebro importantes para a manutenção da integridade da barreira sangue-cérebro, a aplicação ou administração da molécula de ligação anti-SEMA4D pode ocorrer no lado do cérebro da barreira sangue-cérebro para bloquear a interação de SEMA4D com seu receptor em astrócitos. Os métodos para permitir que os fatores passem através da barreira sangue-cérebro incluem minimizar o tamanho do fator, fornecendo fatores hidrofóbicos que podem passar mais facilmente através da conjugação do agente de modulação a uma molécula portadora que tem um coeficiente de permeabilidade substancial através da barreira sangue-cérebro.

[0111]Em uma outra forma de realização, a composição farmacêutica compreendendo a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a um paciente, pode ser liberada em qualquer forma convencional, incluindo qualquer forma conhecida na técnica em que ela pode desviar da barreira sangue-cérebro (isto é, atua no lado do sangue). Devido à interação de SEMA4D com um receptor em células endoteliais, a aplicação ou administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D pode ocorrer no lado do sangue da barreira sangue-cérebro. Através da administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D por uma via que expõe a mesma ao lado do sangue, por exemplo, incluindo, mas não limitada à administração intravenosa, a molécula de ligação anti-SEMA4D inibirá a interação of SEMA4D com o receptor de SEMA4D ou

uma porção do receptor que é expressada pelas células endoteliais. Em uma outra forma de realização a barreira sangue-cérebro pode ser desviada, por exemplo, através de transfecção *in vivo* de células com vetores de expressão contendo genes que codificam para fatores de crescimento, de modo que as células por si só produzam o fator. Qualquer modificação genética útil das células está no escopo da presente invenção. Por exemplo, além da modificação genética das células para expressar fatores de crescimento, as células podem ser modificadas para expressar outros tipos de agentes neurológicos, tais como neurotransmissores. Preferivelmente, a modificação genética é realizada por infecção das células que revestem as regiões ventriculares com retrovírus recombinantes ou transfecção usando métodos conhecidos na técnica.

[0112]As moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação dos mesmos descritos neste relatório são úteis para o tratamento de vários transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC. Em algumas formas de realização, o tratamento dos transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC é intencional a incluir a promoção da neurogênese. Em outras formas de realização, o tratamento dos transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC é intencional a incluir um aumento na proliferação de células progenitoras. Em outras formas de realização, o tratamento dos transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC é intencional a acentuar a diferenciação de células progenitoras. Em outras formas de realização, o tratamento de transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neuro-

degenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC, é intencionado a aumentar a sobrevivência de células precursoras ou progenitoras.

[0113]Em uma forma de realização, a invenção se refere ao uso das moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos, como um medicamento, em particular, para o uso no tratamento ou profilaxia de transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC para promover neurogênese através do aumento da proliferação, realce da diferenciação e/ou aumento da sobrevivência de células precursoras ou progenitoras. Em certas formas de realização, o método da aplicação aumenta o número de, acentua a diferenciação de, e/ou aumenta a sobrevivência de células progenitoras.

[0114]De acordo com os métodos da presente invenção, pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado do mesmo, conforme definido neste relatório, pode ser usada para promover uma resposta terapêutica positiva com respeito aos transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC.

[0115]Uma “resposta terapêutica positiva” com respeito ao transtorno do sistema nervoso central é intencionada a incluir uma melhora na doença em associação com a atividade anti-inflamatória, atividade antiangiogênica, atividade antiapoptótica ou semelhantes, destes anticorpos, e/ou uma melhora nos sintomas associados com a doença. Isto é, um efeito antiproliferativo, a prevenção de proliferação adicional da célula que expressa SEMA4D ou da célula que expressa o receptor para SEMA4D, uma redução na resposta inflamatória, incluindo, mas não limitada à

secreção reduzida de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, proteases, imunoglobulinas (em exemplos onde a célula portadora de SEMA4D ou receptor de SEMA4D é uma célula B), combinações das mesmas, e semelhantes, produção aumentada de proteínas anti-inflamatórias, uma redução no número de células autorreativas, um aumento na tolerância imune, inibição da sobrevivência de células autorreativas, redução na apoptose, redução na migração de células endoteliais, aumento na migração de monócitos espontânea, redução em e/ou uma diminuição em um ou mais sintomas mediados pelo estímulo de sSEMA4D ou células que expressam SEMA4D podem ser observados. Tais respostas terapêuticas positivas não são limitadas à via de administração e podem compreender a administração ao doador, ao tecido do doador (tal como, por exemplo, perfusão do órgão), ao hospedeiro, qualquer combinação dos mesmos e semelhantes. Em particular, os métodos fornecidos neste relatório são dirigidos à inibição, prevenção, redução, alívio ou diminuição do desenvolvimento de um transtorno neuroinflamatório em um paciente. Assim, por exemplo, uma melhora na doença pode ser caracterizada como uma ausência de sintomas clinicamente observáveis, um aumento na proliferação, diferenciação e/ou sobrevivência de células precursoras ou progenitoras. As moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou ligação ao antígeno fragmentos, variantes, ou derivados dos mesmos, podem ser usados em combinação com pelo menos um ou mais tratamentos para transtornos neuroinflamatórios; onde a terapia adicional é administrada antes, durante ou subsequente à molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, terapia com anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo. Assim, onde as terapias combinadas compreendem a administração de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, em combinação com a administração de um outro agente terapêutico, os métodos da invenção abrangem a coadministração, usando formulações separadas ou uma for-

mulação farmacêutica única, com administração simultânea ou consecutiva em qualquer ordem.

[0116]VI. Composições Farmacêuticas e Métodos de Administração

[0117]Os métodos para a preparação e administração de moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos a um indivíduo em necessidade dos mesmos são bem conhecidos ou são facilmente determinados por aqueles habilitados na técnica. A via de administração da molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, pode ser, por exemplo, oral, parenteral, por inalação ou tópica. O termo parenteral, conforme usado neste relatório, inclui, por exemplo, administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal. Embora todas estas formas de administração sejam claramente consideradas no escopo da invenção, um exemplo de uma forma para a administração seria uma solução para injeção, em particular, para injeção intravenoso ou intra-arterial ou gotas. Uma composição farmacêutica adequada para injeção pode compreender um tampão (por exemplo, tampão acetato, fosfato ou citrato), um tensoativo (por exemplo, polissorbato), opcionalmente um agente estabilizador (por exemplo, albumina humana), etc. Entretanto, em outros métodos compatíveis com os ensinamentos neste relatório, as moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos podem ser diretamente liberados ao sítio da população celular adversa, desse modo, aumentando a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[0118]Conforme debatido neste relatório, moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos, podem ser administradas em uma quantidade farmacêuticamente eficaz para o tratamento *in vivo* de transtornos neuroinflamatórios. Neste

respeito, será avaliado que as moléculas de ligação divulgadas podem ser formuladas, de modo a facilitar a administração e promover estabilidade do agente ativo. Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas, de acordo com a presente invenção, compreendem um portador farmacêuticamente aceitável, não tóxico e estéril, tal como solução salina fisiológica, tampões não tóxicos, preservantes e semelhantes. Para os propósitos do presente pedido, uma quantidade farmacêuticamente eficaz de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, deve ser mantida para significar uma quantidade suficiente para obter ligação eficaz a um alvo e obter um benefício, por exemplo, promover neurogênese em um indivíduo que apresenta transtornos do sistema nervoso central, tais como transtornos neurodegenerativos, transtornos neuroinflamatórios, lesões cerebrais agudas e certas disfunções do SNC.

[0119]As composições farmacêuticas usadas nesta invenção compreendem portadores farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, trocadores iônicos, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas do soro, tais como albumina de soro humana, substâncias tampão, tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeos parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de dissódio, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias com base em celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose sódica, poliácridatos, ceras, polímeros em bloco de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol e lanolina.

[0120]Preparações para administração parenteral incluem solução, suspensões e emulsões estéreis aquosas ou não aquosas. Exemplos de solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. Portadores aquosos inclu-

em, por exemplo, água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meio tamponado. Na presente invenção, portadores farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a tampão fosfato de 0,01 a 0,1 M e, preferivelmente, 0,05 M ou solução salina a 0,8 %. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, solução de Ringer lactada ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutrientes, reabastecedores de eletrólitos, tais como aqueles com base em dextrose de Ringer e semelhantes. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes, tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes e semelhantes.

[0121]Mais particularmente, as composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções estéreis aquosas (onde solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões estéreis injetáveis. Em tais casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida em um grau que ocorra fácil seringabilidade. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenagem e, preferivelmente, será preservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O portador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Formulações adequadas para o uso nos métodos terapêuticos divulgados neste relatório são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

[0122]A prevenção da ação de micro-organismos pode ser obtida através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível

incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0123][0122] Em qualquer caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação de um composto ativo (por exemplo, um anticorpo anti-SEMA4D, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, por si só ou em combinação com outros agentes ativos) na quantidade exigida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados neste relatório, conforme exigido, seguido por esterilização por filtração. Em geral, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto ativo em um veículo estéril, que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes exigidos a partir daqueles enumerados acima, no caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e liofilização, o que fornece um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente estéril-filtrada do mesmo. As preparações para as injeções são processadas, enchidas em recipientes, tais como ampolas, bolsas, frascos, seringas ou pequenas garrafas e vedadas sob condições assépticas, de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Além disso, as preparações podem ser empacotadas e vendidas na forma de um kit. Tais artigos de fabricação podem ter marcações ou insertos no pacote indicando que as composições associadas são úteis para tratar um indivíduo que sofre de, ou pré-disposto a uma doença ou transtorno.

[0124]Formulações parenterais podem ser uma dose em bolo única, uma infusão ou uma dose em bolo de carregamento, após uma dose de manutenção. Estas composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, por exemplo, uma vez ao dia, ou em uma base “necessária”.

[0125] Certas composições farmacêuticas usadas nesta invenção podem ser oralmente administradas em uma forma de dosagem aceitável incluindo, por exemplo, cápsulas, tabletes, suspensões ou soluções aquosas. Certas composições farmacêuticas também podem ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em solução salina, utilizando álcool benzílico ou outros preservantes adequados, promotores de absorção para acentuar a biodisponibilidade e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais.

[0126] A quantidade de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo, ou fragmento, variante ou derivado do mesmo, que será combinada com os materiais portadores para produzir uma forma de dosagem única variará, dependendo do hospedeiro tratado e do modo de administração particular. A composição pode ser administrada como uma dose única, múltiplas doses ou durante um período de tempo estabelecido em uma infusão. Os regimes de dosagem também podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática).

[0127] De acordo com o escopo da presente divulgação, anticorpos anti-SEMA4D, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos podem ser administrados a um ser humano ou outro animal, de acordo com os métodos de tratamento anteriormente mencionados em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Os anticorpos anti-SEMA4D ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados dos mesmos podem ser administrados a tal ser humano ou outro animal em uma forma de dosagem convencional preparada através da combinação do anticorpo da invenção com um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável convencional, de acordo com técnicas conhecidas. Será reconhecido por uma pessoa habilitada na técnica que a forma e caráter do portador ou diluente farmacêuticamente aceitável são ditados pela quantidade de ingrediente

ativo com o qual deve ser combinada, pela via de administração e outras variáveis bem conhecidas. Aqueles habilitados na técnica ainda avaliarão que um coquetel compreendendo uma ou mais espécies de moléculas de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção pode ser usado.

[0128]“Dose ou quantidade terapêuticamente eficaz” ou “quantidade eficaz” é intencionada a uma quantidade de molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, que quando administrada ocasiona uma resposta terapêutica positiva com respeito ao tratamento de um paciente com uma doença que será tratada, por exemplo, aumento da proliferação, realce da diferenciação e/ou aumento da sobrevivência de células precursoras ou progenitoras.

[0129]Doses terapêuticamente eficazes das composições da presente invenção para a promoção de neurogênese variam dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é ser humano ou um animal, outras medicações administradas e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em certas formas de realização, o paciente é um ser humano, mas mamíferos não humanos, incluindo mamíferos transgênicos, também podem ser tratados. As dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos àqueles habilitados na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

[0130]A quantidade de pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação, variante ou derivado do mesmo, que será administrada é facilmente determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica sem experimentação indevida dada a divulgação da presente invenção. Fatores que influenciam o modo de administração e a quantidade respectiva de pelo menos uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo, frag-

mento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo incluem, mas não são limitados à severidade da doença, ao histórico da doença e à idade, altura, peso, saúde e condição física do indivíduo que sofre a terapia. Similarmente, a quantidade da molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo ou fragmento, variante ou derivado do mesmo, que será administrada será dependente do modo de administração e se o indivíduo sofrerá uma dose única ou múltiplas doses deste agente.

[0131]A invenção também fornece o uso de uma molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo da invenção ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo, na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo para tratar um transtorno neuroinflamatório, em que o medicamento é usado em um indivíduo que foi pré-tratado com pelo menos uma outra terapia. “Pré-tratado” ou “pré-tratamento” significa que o indivíduo recebeu uma ou mais terapias (por exemplo, foi tratado com pelo menos uma outra terapia neuroinflamatória) antes de receber o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo. “Pré-tratado” ou “pré-tratamento” inclui indivíduos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia dentro de 2 anos, dentro de 18 meses, dentro de 1 ano, dentro de 6 meses, dentro de 2 meses, dentro de 6 semanas, dentro de 1 mês, dentro de 4 semanas, dentro de 3 semanas, dentro de 2 semanas, dentro de 1 semana, dentro de 6 dias, dentro de 5 dias, dentro de 4 dias, dentro de 3 dias, dentro de 2 dias ou ainda dentro de 1 dia antes do início do tratamento com o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, o anticorpo monoclonal VX15/2503 divulgado neste relatório, ou fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado do mesmo. Não é necessário que o indivíduo tenha sido um respondedor ao pré-tratamento com a terapia ou terapias anteriores. Assim, o indivíduo que recebe o medicamento que compreende a molécula de ligação anti-SEMA4D, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, variante

ou derivado do mesmo pode ter respondido, ou pode ter falhado ao responder ao pré-tratamento com a terapia anterior ou a uma ou mais entre as terapias anteriores onde o pré-tratamento compreendeu múltiplas terapias.

[0132]A prática da presente invenção utilizará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante e imunologia, que pertencem à habilidade da técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Veja, por exemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^o ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I e II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente U.S. Nº 4.683.195; Hames e Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames e Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller e Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 e 155; Mayer e Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir e Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); e em Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley e Sons, Baltimore, Md.).

[0133]Princípios gerais de construção de anticorpos são apresentados em Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2^o ed.; Oxford Univ. Press). Princípios gerais de construção de proteína são apresentados em Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford,

Eng.). Princípios gerais de anticorpos e ligação de anticorpo-hapteno são apresentados em: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2^o ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); e Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman e Hall, Nova Iorque, N.Y.). Adicionalmente, os métodos padrão em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos são geralmente seguidos como em *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Stites *et al.*, eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8^o ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) e Mishell e Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman e Co., NY).

[0134]Trabalhos de referência padrão que apresentam princípios gerais de imunologia incluem *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" em *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Amsterdã); Goldsby *et al.*, eds. (2000) *Kuby Immunology* (4^a ed.; H. Freeman & Co.); Roitt *et al.* (2001) *Immunology* (6^a ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5^a ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann e Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook e Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow e Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach e Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

[0135]Todas as referências citadas acima, assim como todas as referências citadas neste relatório, são integralmente incorporadas neste relatório como referência.

[0136]Os exemplos seguintes são sugeridos por via de ilustração e não por

via de limitação.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: PROJETO EXPERIMENTAL

[0137]O projeto experimental básico é mostrado na FIG. 1. Camundongos machos, 6 semanas de vida, CB-17/lcr-1/1Jcl (“camundongos CB-17”) foram usados para avaliar o efeito de anticorpos anti-SEMA4D sobre a neurogênese após lesão por acidente vascular cerebral. Os camundongos foram submetidos à oclusão (OACM) da artéria cerebral média (ACM). Em breve, os animais foram colocados sob anestesia profunda induzida com halotano a 4 % em uma mistura de oxigênio a 30 %/óxido nítrico a 70 % e o plano anestésico foi mantido com halotano entre 1 a 2 %. isquemia cerebral focal permanente foi produzida por ligação e desligamento da porção distal da artéria cerebral média esquerda (ACM), conforme descrito em outro lugar (Taguchi *et al.*, 2004, 2007). A ACM esquerda foi isolada, eletrocauterizada e desconectada apenas distal ao cruzamento do trato olfativo (porção MI distal) com animais sob anestesia com halotano. O fluxo cérebro-sangue (CBF) na área da ACM foi monitorado, conforme previamente descrito (Matsushita *et al.*, 1998). O infarto cerebral produzido nesta cepa de camundongo é altamente reproduzível e limitado ao córtex cerebral ipsilateral (Taguchi *et al.*, 2004, 2007).

[0138]Após a oclusão, os camundongos foram divididos em dois grupos: o grupo tratamento foi injetado com anticorpo anti-SEMA4D MAb 67-2 e o grupo controle foi injetado com isotipo IgG controle MAb 2B8. Os camundongos receberam 0,6 mg/kg de anticorpo monoclonal por intermédio de injeção intraperitoneal (IP) em 1 hora, 3 horas, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias depois da OACM.

[0139]No dia 7 após a OACM, um subgrupo de animais a partir de cada coorte injetada com anticorpo foi sacrificado, os cérebros extraídos e os tecidos analisados por imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR).

[0140] Para as análises imuno-histoquímicas de seções do cérebro, os animais foram perfundidos com paraformaldeído-lisina-periodato a 2 % (PLP) fixativo (HCl de lisina 0,75 M/periodato 0,01 M/tampão fosfato 0,075 M), e os cérebros foram cortados em seções em série de 20 µm de espessura em um criostato. Seções do cérebro foram tratadas com H₂O₂ a 0,1 % para extinção, lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas durante a noite com um ou mais entre os seguintes anticorpos primários: anti-NeuN para neurônios, anti-Nestin e anti-Sox2 para células tronco/precursoras neurais em tampão de diluição (Triton-X-100 a 0,3 %/soro de cavalo a 5 %/PBS). Depois que foram lavadas três vezes em PBS, as seções foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados durante 3 horas, e para pigmentação de NeuN, depois foram visualizadas pela reação de ABC usando o Kit peroxidase ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA) com diamina benzidina (DAB; Sigma). Para imunocitoquímica dupla de Nestin/Sox2, anticorpos secundários marcados com FITC-(Sox2) e Cy3 (Nestin) foram usados. Fotomicrografias fluorescentes foram obtidas com um microscópio confocal a laser. Os resultados são mostrados nas Figuras 2A a E e debatidos em detalhes abaixo.

[0141] Para as análises de RT-PCR, o RNA total foi isolado a partir de tecido cerebral microdissecado no dia 7 pós-OACM e o cDNA preparado. O cDNA foi amplificado por PCR sob as seguintes condições: 15 s a 94 °C, 30 s a 56 °C e 1 min a 68 °C (40 ciclos). Sequências de *primer* foram as seguintes: nestin *forward*, CACTAGAAAGCAGGAACCAG (SEQ ID NO: 11) e nestin *reverse*, AGATGGTTCACAATCCTCTG (SEQ ID NO: 12) (tamanho do amplicon, 307 bp); Sox2 *forward*, TTGGGAGGGGTGCAAAAAGA (SEQ ID NO: 13) e Sox2 *reverse*, CCTGCGAAGCGCCTAACGTA (SEQ ID NO: 14) (tamanho do amplicon, 312 bp); proteína de proteolipídeo (PLP) *forward*, TGAGCGCAACGGTAACAGG (SEQ ID NO: 15) e PLP *reverse*, GGGAGAACACCATACATTCTGG (SEQ ID NO: 16) (tamanho do amplicon, 295 bp); e β-actina *forward*, GCTCGTCGTCGACAAGGGCTC (SEQ ID

NO: 17) e β -actina *reverse*, CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC (SEQ ID NO: 18) (tamanho do amplicon, 353 bp). Os resultados são mostrados nas Figuras 3A a D e debatidos em detalhes abaixo.

[0142]As avaliações comportamentais foram realizadas nas coortes remanescentes de camundongos nos dias 14 e 30 após a OACM. Para avaliar a função cortical, os camundongos foram analisados através do teste comportamental usando a tarefa de habituação ao campo aberto. Brevemente, os animais foram deixados livremente para pesquisa em uma caixa de acrílico quadrada (30 x 3 x 30 cm) durante 20 minutos. Uma fonte de luz no teto da área delimitada ocorreu durante os primeiros 10 min (período de luz) e sem luz durante um período de 10 minutos subsequentes (período escuro). Nos bancos X e Y do campo aberto, dois feixes de infravermelho foram montados 2 cm acima do piso, espaçados com intervalos de 10 cm, formando um circuito *flip-flop* entre os mesmos. O número total de cruzamentos de feixe pelo animal foi contado e registrado como comportamento de movimento (locomoção). Os resultados são mostrados nas Figuras 6A a C e debatidos em detalhes abaixo.

[0143]No dia 30 após a OACM, as coortes remanescentes de camundongos foram sacrificadas e os cérebros processados para imuno-histoquímica com NeuN. Os camundongos foram perfundidos de maneira transcardíaca com paraformaldeído a 4 %, os cérebros foram removidos e seções coronais (14 μ m) foram pigmentadas com anticorpo de camundongo para NeuN, seguido por reação com IgG anti-camundongo de cabra biotinizada (Chemicon, Temecula, CA; 1/500), Kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA), e DAB (Sigma) como cromogênio. A área do hemisfério cerebral ipsilateral e contralateral ocupada pelo marcador nuclear neuronal NeuN foi medida usando Image J. O volume do hemisfério cerebral ipsilateral e contralateral foi calculado através da integração da área do hemisfério cerebral ipsilateral e contralateral orientada de maneira coronal. A involução do volume do he-

misfério cerebral ipsilateral foi calculada como (volume do hemisfério cerebral ipsilateral/contralateral). Os resultados são mostrados nas Figuras 4A a D e Figuras 5A a B e debatidos em detalhes abaixo.

EXEMPLO 2: EFEITO DO ANTICORPO ANTI-SEMA4D SOBRE A PRESENÇA DE CÉLULAS TRONCO/PRECURSORAS NEURAIIS NO CÉREBRO OACM

[0144]Em 7 dias depois da OACM, o efeito do anticorpo anti-SEMA4D sobre a presença de células tronco/precursoras neurais foi examinado. A FIG. 2 mostra imagens de pigmentação imunocitoquímica de tecido isquêmico a partir de 2 áreas representativas na borda do infarto (simbolizadas na Figura 2E) de camundongos tratados com isotipo controle (painéis da esquerda, A e C) e com anticorpo anti-SEMA4D (painéis da direita, B e D). Estes resultados mostram que os camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D têm expressão aumentada de proteínas marcadoras de células tronco/progenitoras neurais em comparação a camundongos tratados com anticorpo controle. Estes dados sugerem que o anticorpo anti-SEMA4D pode proteger populações de células tronco/precursoras neurais e/ou induzir neurogênese no cérebro isquêmico.

[0145]A expressão do mRNA de células tronco/precursoras neurais em camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D e isotipo controle foi detectada por RT-PCR convencional no tecido isquêmico no dia 7 depois da OACM. Estes resultados são mostrados nas FIGS. 3A a D. Os resultados mostram um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de Sox2, nestin e PLP em relação ao gene “que mantém a casa” (*housekeeping*), β -actina, em camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D em comparação àqueles tratados com anticorpo isotipo controle. Visto que Sox2 e nestin são marcadores para células tronco/precursoras neurais, a expressão aumentada destes marcadores após o tratamento com anticorpo anti-SEMA4D sugere que o anticorpo anti-SEMA4D pode promover neurogênese. Um aumento na neu-

rogênese observado depois do tratamento anti-SEMA4D no cérebro isquêmico pode ser um resultado de proliferação aumentada de células tronco/precursoras neurais e/ou sobrevivência aumentada de células tronco/precursoras neurais recém formadas.

EXEMPLO 3: EFEITO DO ANTICORPO ANTI-SEMA4D SOBRE O VOLUME CEREBRAL DEPOIS DE INFARTO CEREBRAL

[0146]Em 30 dias depois da OACM, o efeito do anticorpo anti-SEMA4D sobre o volume do cérebro foi examinado. As FIGS. 4A a 4B mostram as seções de cérebro pigmentadas com um anticorpo específico para o marcador neuronal maduro, NeuN, a partir de 1 camundongo isotipo controle representativo (esquerda, 4A) e 1 camundongo tratado com anticorpo anti-SEMA4D representativo (direita, 4B). O volume cerebral é representado pelo volume do estriado (linha cheia) e do hemisfério (linha tracejada). As FIGS. 4C a 4D mostram a razão calculada (L/) do volume do estriado e hemisfério, respectivamente, para cada grupo de camundongos tratados. Embora não exista diferença estatisticamente significativa no volume hemisférico total dos cérebros (linha tracejada) entre camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D e aqueles tratados com isotipo controle, camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D apresentam volume do estriado significativamente maior (linha cheia) em relação a camundongos tratados com anticorpo controle. Estes dados sugerem que as regiões do estriado próximas ao insulto isquêmico focal podem ser protegidas pelo tratamento com anticorpo anti-SEMA4D.

EXEMPLO 4: EFEITO DO ANTICORPO ANTI-SEMA4D SOBRE A PRESENÇA DE NEURÔNIOS NO CÉREBRO OACM

[0147]Em 30 dias depois da OACM, o efeito do anticorpo anti-SEMA4D sobre a presença de neurônios no cérebro foi examinada. A FIG. 5 mostra imagens pigmentadas com NeuN de tecido isquêmico cerebral a partir de 1 camundongo isotipo controle representativo (painéis da parte inferior, 5B) e 1 camundongo tratado

com anticorpo anti-SEMA4D representativo (painéis da parte superior, 5A). Estes resultados mostram que os camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D têm expressão aumentada do marcador celular neuronal maduro, NeuN, no estriado na borda do infarto cerebral (setas), em comparação aos camundongos tratados com anticorpo controle. Estes dados sugerem que o tratamento com anticorpo anti-SEMA4D promove o desenvolvimento de neurônios maduros, potencialmente através da proteção de populações de células tronco/precursoras neurais e/ou indução da neurogênese no cérebro isquêmico.

EXEMPLO 5: EFEITO DO ANTICORPO ANTI-SEMA4D SOBRE A ATIVIDADE COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS OACM

[0148]Em 30 dias depois da OACM, o efeito do anticorpo anti-SEMA4D sobre a atividade comportamental foi examinado. Os camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D e IgG controle foram submetidos a um teste de campo aberto durante 10 minutos sob o meio claro e escuro. As FIGS. 6A a 6B mostram como os camundongos que sofrem OACM (camundongos tratados com IgG controle e anticorpo anti-SEMA4D) apresentam atividade significativamente maior na fase de luz ($p < 0,05$) em comparação aos camundongos tratados com simulação, mas não na fase escura. Os camundongos usualmente apresentam atividade aumentada quando são colocados no escuro a partir do ambiente claro. A FIG. 6C mostra que a razão da atividade de locomoção na fase escura/clara foi significativamente melhorada em camundongos tratados com anticorpo anti-SEMA4D, em comparação aos camundongos tratados com simulação, ao contrário dos camundongos tratados com anticorpo controle ($p < 0,05$). As razões na fase escura/clara não foram significativamente diferentes entre o grupo anti-SEMA4D e simulação. Estes resultados sugerem que o tratamento com anticorpo anti-SEMA4D de camundongos lesionados por OACM pode atuar para normalizar suas respostas aos estímulos no claro/escuro, enquanto os camundongos que recebem IgG controle parecem manter atividade no escuro/claro

anormal tipicamente exibida por camundongos lesionados por OACM.

EXEMPLO 6: EFEITO DO ANTICORPO ANTI-SEMA4D SOBRE A INTEGRIDADE DA BARREIRA SANGUE-CÉREBRO E NEUROGÊNESE

[0149]Um outro estudo será conduzido para avaliar o(s) efeito(s) de anti-SEMA4D sobre a barreira sangue-cérebro (integridade da BBB) e neurogênese em um modelo de rato da oclusão da artéria cerebral média permanente (OACM).

[0150]O projeto experimental básico é mostrado na FIG. 7. Os ratos serão submetidos à oclusão (OACM) da artéria cerebral média (ACM). Após a oclusão, os ratos serão divididos em três grupos de 15 ratos: um grupo tratamento será injetado com anticorpo anti-SEMA4D MAb 67-2, um grupo controle será injetado com IgG isotipo controle MAb 2B8 e um grupo não OACM será injetado com IgG isotipo controle MAb 2B8. Os ratos receberão 15,0 mg/kg de anticorpo monoclonal via injeção intraperitoneal (IP) em 1 hora, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias depois da OACM. As amostras de sangue serão coletadas periodicamente para avaliação posterior de níveis de fármaco. Os ratos receberão injeções de anticorpo programadas e sofrerão teste comportamental (teste do cilindro e teste de colocação do membro) durante um período de 4 semanas.

[0151]O imageamento por ressonância magnética (MRI) será usado para avaliar a integridade da BBB de 5 ratos aleatoriamente selecionados a partir de cada grupo tratamento. Um outro subgrupo de ratos (isto é, 5 ratos) receberá injeções BrdU i.p. nos Dias 4 a 6 para marcar células neuroprogenitoras. No final, o subgrupo de ratos que receberam BrdU será perfundido com paraformaldeído a 4 % e os cérebros extraídos. O terceiro subconjunto de ratos será perfundido com solução salina, os cérebros microdissecados e tecido congelado fresco. Cérebros extraídos/tecidos microdissecados sofrerão avaliação imuno-histoquímica e bioquímica da ativação da microglia e neurogênese.

[0152]Diversas modificações e outras formas de realização das invenções

apresentadas neste relatório virão à mente de uma pessoa habilitada na técnica a qual estas invenções pertencem tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições precedentes e nos desenhos associados. Portanto, deve ser entendido que as invenções não devem ser limitadas às formas de realização específicas divulgadas e que as modificações e outras formas de realização podem ser incluídas no escopo das reivindicações anexas e lista das formas de realização divulgadas neste relatório. Embora os termos específicos sejam utilizados neste relatório, eles são usados apenas em um sentido genérico e descritivo e não para propósitos de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente à semaforina-4D (SEMA4D) e compreende um domínio variável de uma cadeia pesada (VH) compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 5, 6 e 7 de VH-CDR1, VH-CDR2, e VH-CDR3, respectivamente, e um domínio variável de uma cadeia leve (VL) compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 8, 9 e 10 de VL-CDR1, VL-CDR2, e VL-CDR3, respectivamente, o referido uso **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na preparação de um medicamento para aumentar um ou mais de: proliferação, diferenciação ou migração de células progenitoras neurais em um indivíduo com necessidade de regeneração neural como um resultado de acidente vascular cerebral.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende um VH compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e um VL compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende um VH compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e um VL compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é formulado para administração à região sanguínea da barreira hematoencefálica.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é formulado para administração à região cerebral da barreira hematoencefálica.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4,

CARACTERIZADO pelo fato de que uma quantidade eficaz do anticorpo ou do fragmento do mesmo, quando formulada para administração a um indivíduo, resulta em um aumento na expressão de um precursor neural ou marcador celular progenitor em um indivíduo.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador é Sox2 e/ou nestina.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é um isotipo IgG.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma quantidade eficaz do anticorpo ou fragmento do mesmo, quando formulada para administração a um indivíduo, resulta em um aumento na diferenciação de células progenitoras neurais.

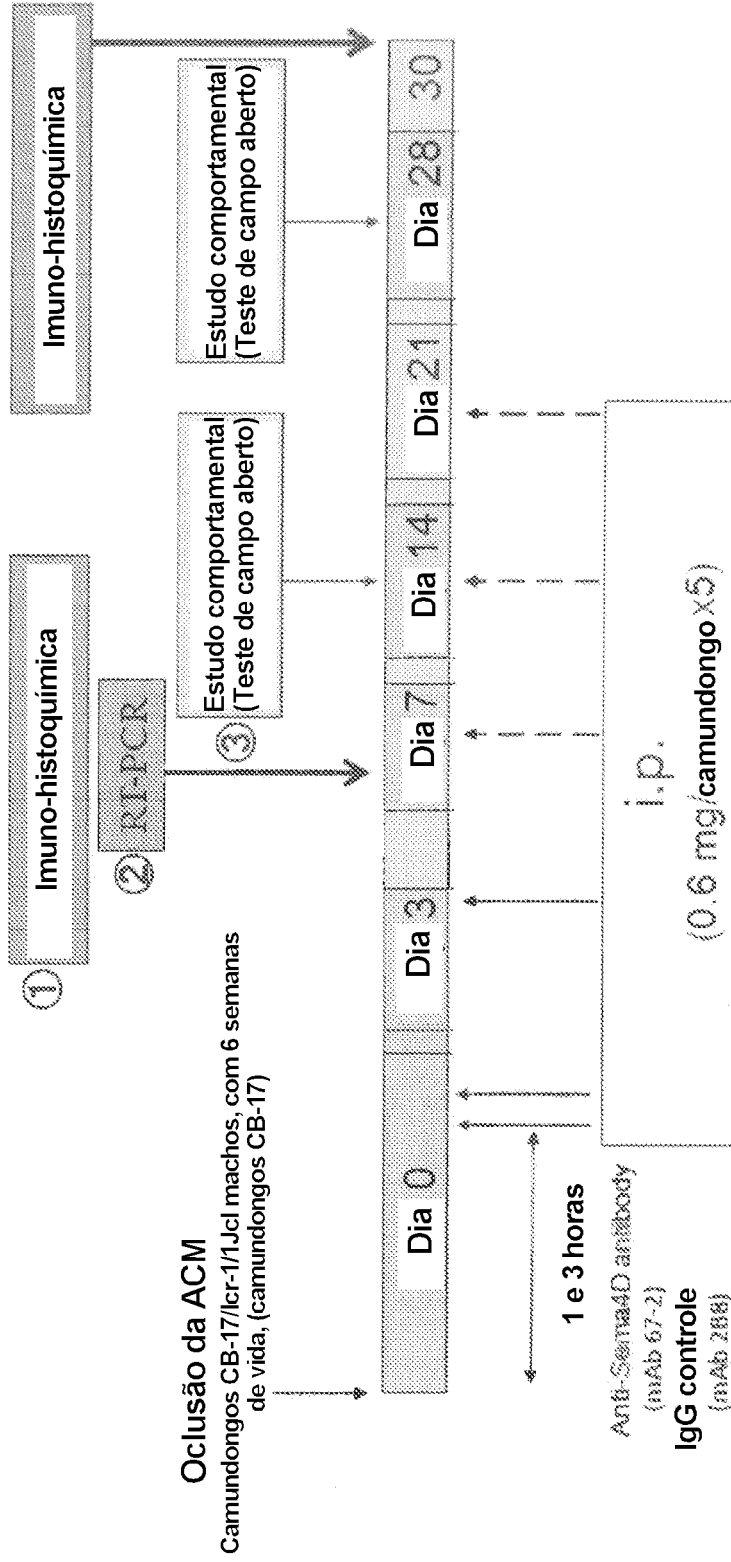


FIG. 1

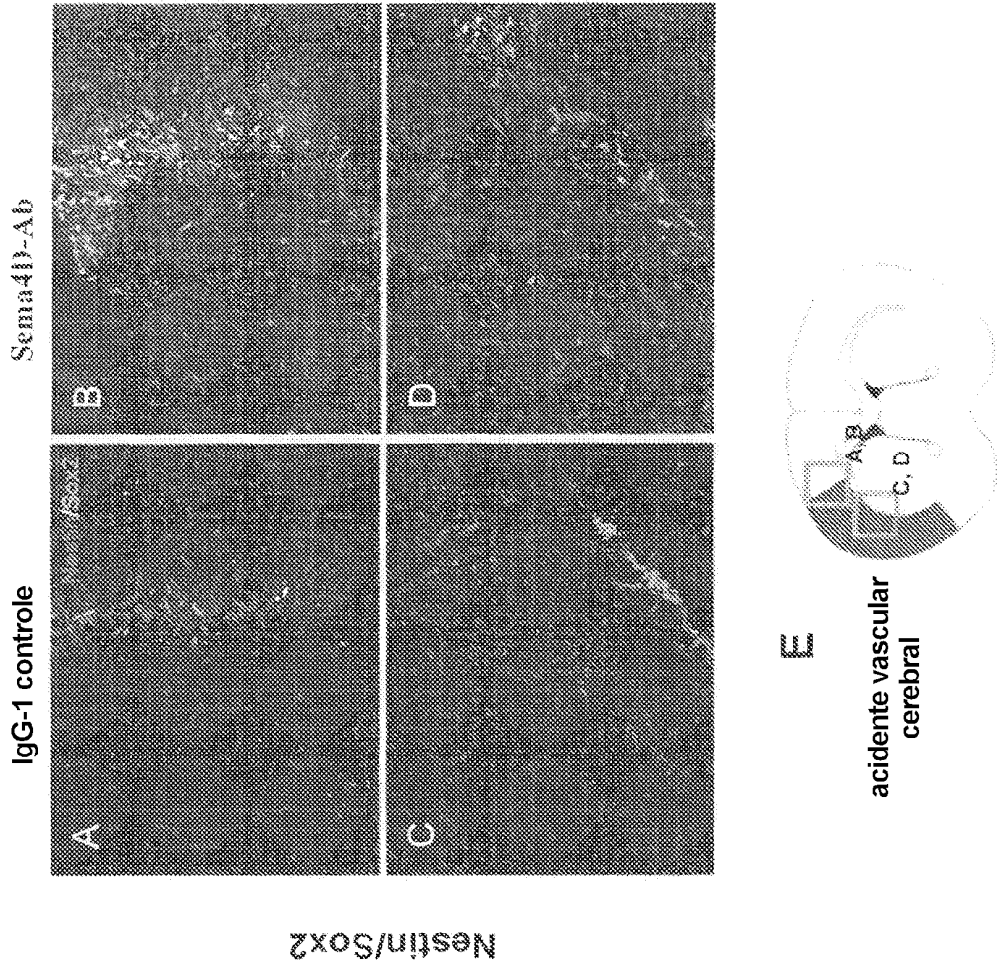


FIG. 2

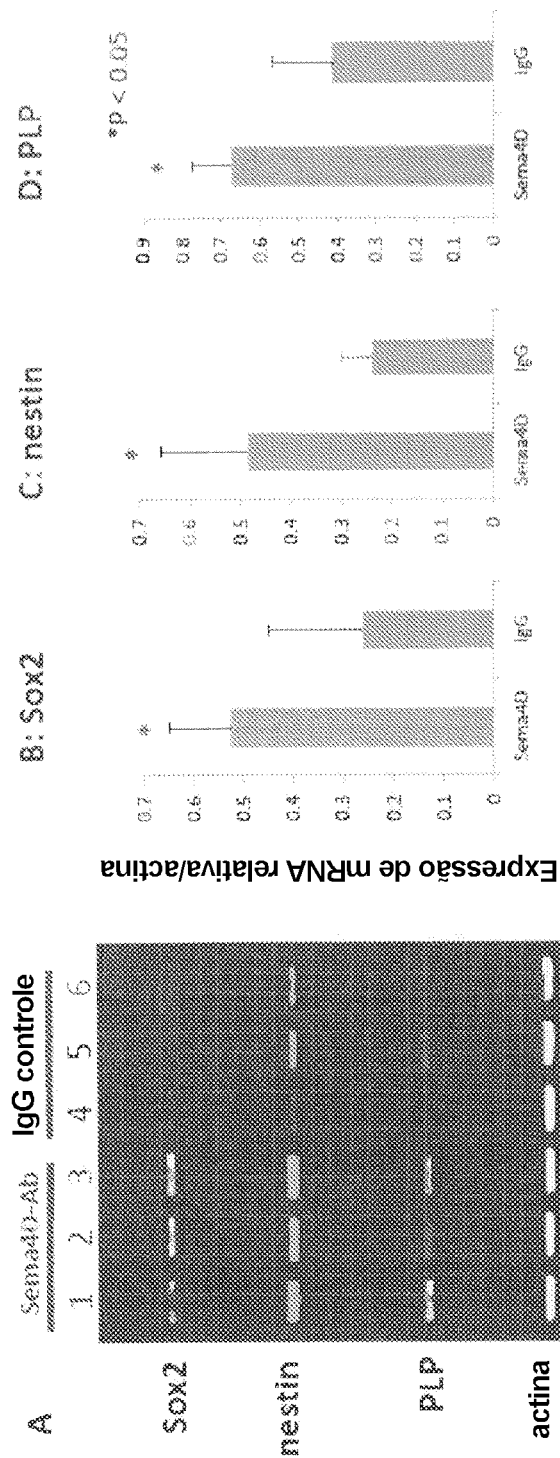


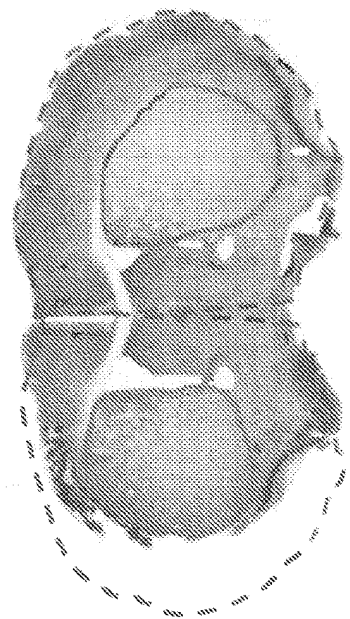
FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

FIG. 3A

IgG controle



Anti-SEMA4D



FIG. 4A

FIG. 4B

razão L/R do estriado

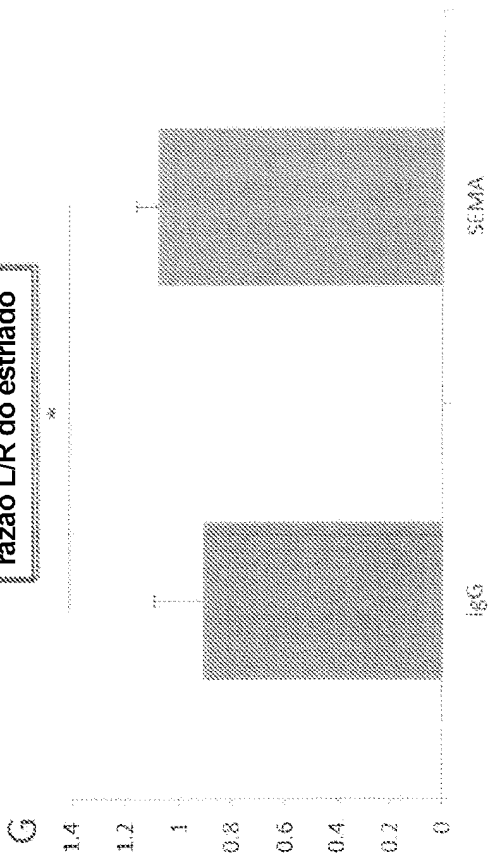


FIG. 4C

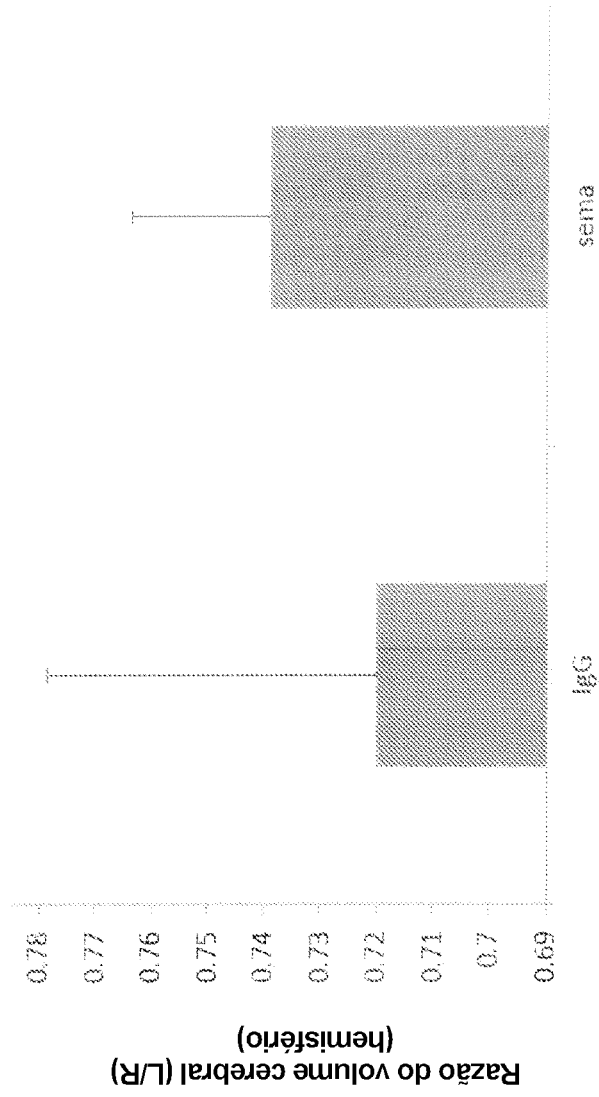


FIG. 4D

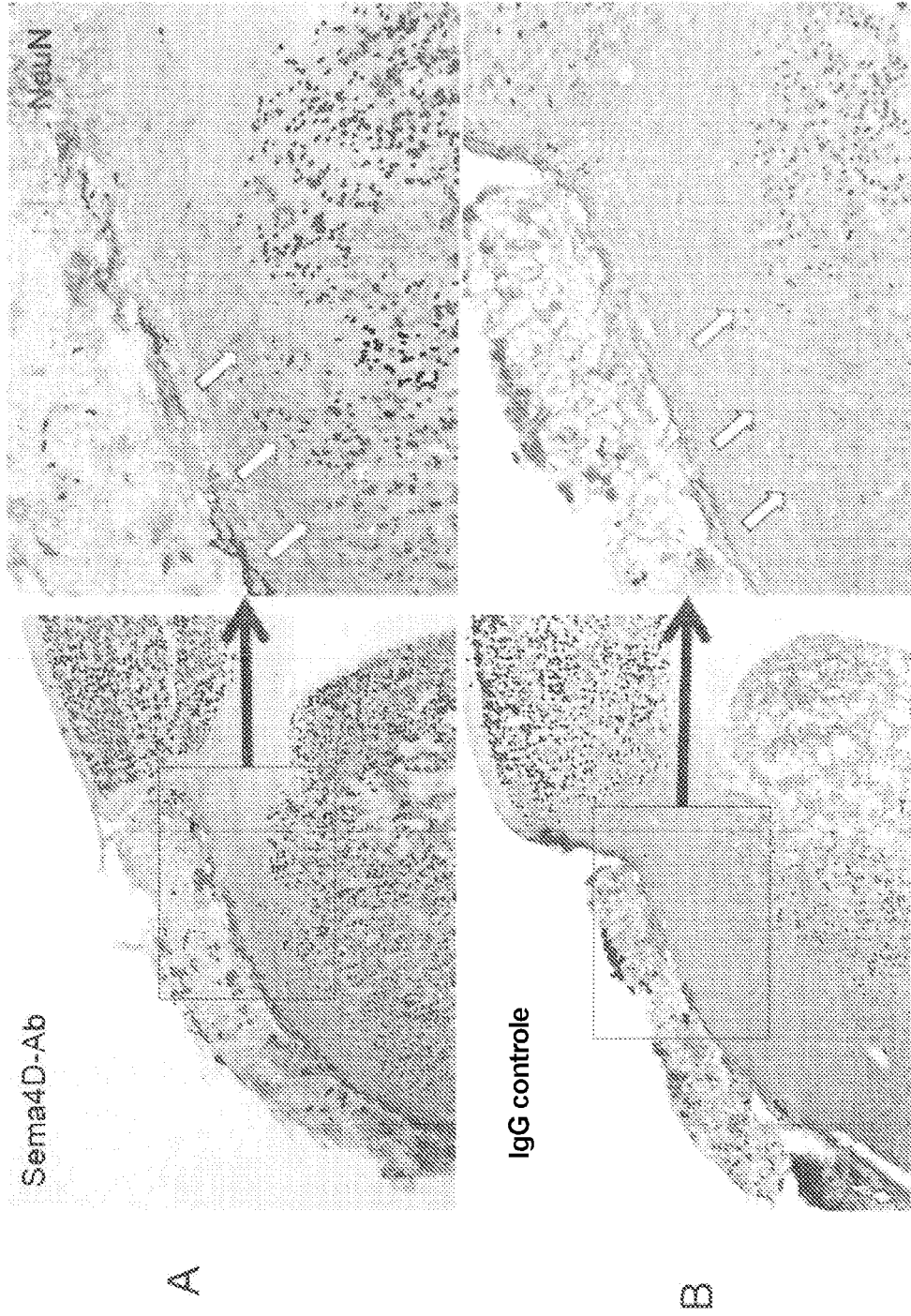


FIG. 5

C. aumento da atividade na fase D

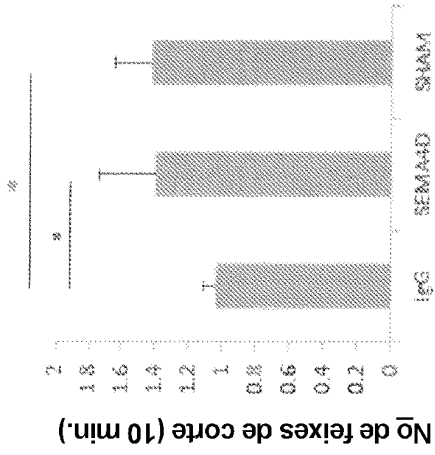


FIG. 6C

B. fase escura

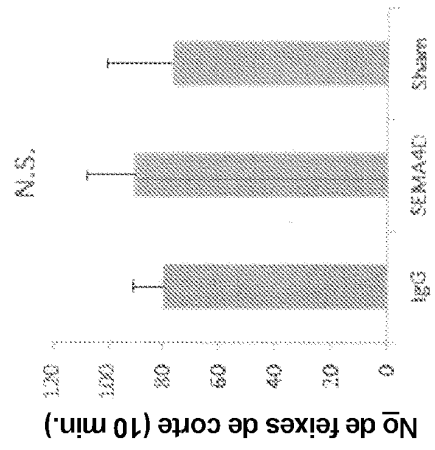


FIG. 6B

A. fase clara

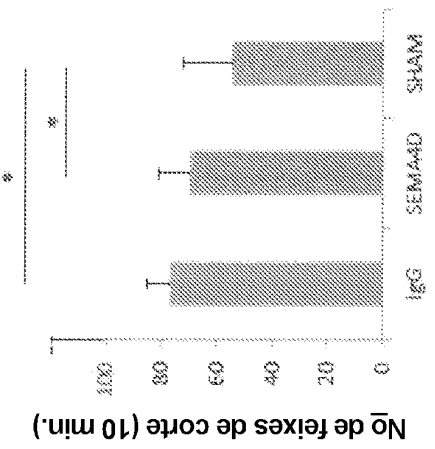


FIG. 6A

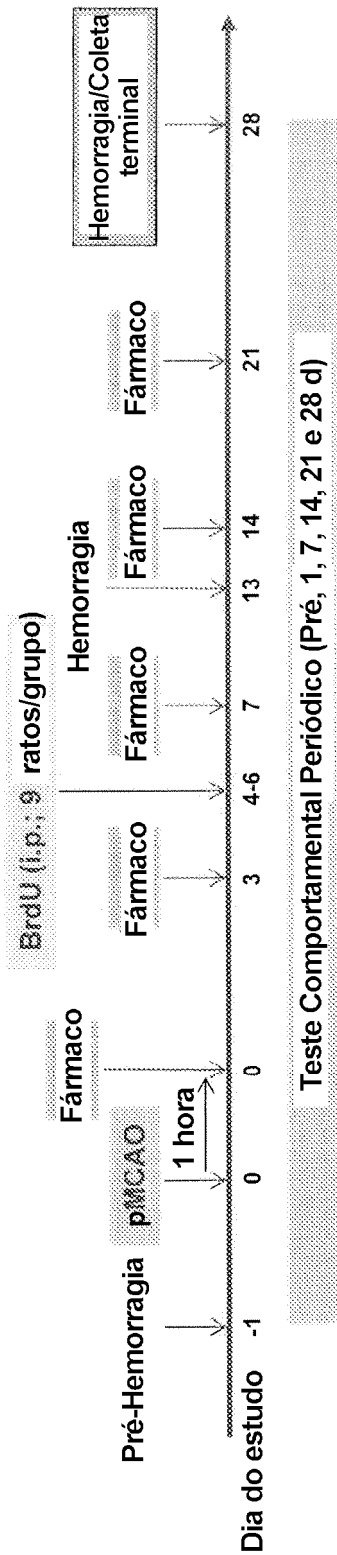


FIG. 7